

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Cirugía**



**TESIS DOCTORAL**

# **Proceso de regeneración hepática : correlación bioquímica-hormonal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Luis Miguel Molina Trigueros**

DIRECTOR:

**Hipólito Durán Sacristán**

**Madrid, 2015**

Luis Miguel Molina Trigueros

TP  
1980  
084



\* 5 3 0 9 8 5 3 4 2 9 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 53 - 004197 - 8

PROCESO DE REGENERACION HEPATICA: CORRELACION BIOQUIMICA-HORMONAL.

Departamento de Cirugía  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1980



BIBLIOTECA

© Luis Miguel Molina Trigueros  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1980  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-17179-1980



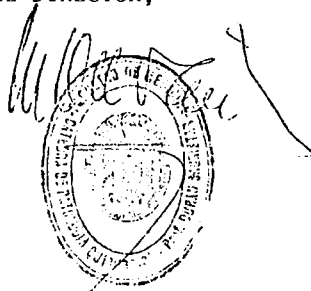
HOSPITAL CLINICO DE SAN CARLOS  
DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA  
MADRID - 3  
CATEDRA DE PATOLOGIA QUIRURGICA  
PROP. DR. DURAN SACRISTAN

HIPOLITO DURAN SACRISTAN, CATEDRATICO DE PATOLOGIA  
QUIRURGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE MADRID,

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral, original  
de D. LUIS MIGUEL MOLINA TRIGUEROS  
" Proceso de regeneración hepática: Co-  
rrelacion bioquímico-hormonal ", ha sido  
realizada bajo mi dirección y patrocinio,  
reuniendo asimismo los requisitos requeri-  
dos para la obtención del grado de Doctor.

Madrid, veintiseis de Enero de mil novecientos  
setenta y nueve.

EL DIRECTOR,





PROCESO DE REGENERACION HEPATICA:  
CORRELACION BIOQUIMICO-HORMONAL.

Trabajo realizado bajo la  
dirección del Prof. Dr. D. Hipólito  
Durán Sacristán, presentado por LUIS  
MIGUEL MOLINA TRIGUEROS, para la ob-  
tención del grado de Doctor en Medi-  
cina y Cirugía por la Universidad  
Complutense de Madrid.

Enero, 1979

A María José,  
Luis y David.

#### AGRADECIMIENTO

En primer lugar, mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Hipólito Durán Sacristán, por la dirección de esta Tesis y la generosa cesión de su tiempo y conocimientos, así como mi permanente gratitud por su decisiva influencia en mi vocación universitaria.

Mi mas sincero agradecimiento a los Dres. P. García Barreno y A. Suárez Sanz, por su asesoramiento y ayuda permanente en la realización de esta Tesis Doctoral.

Estoy igualmente en deuda con el Dr. José Angel De Diego Carmona, por la aportación de su rigor científico, su cercana presencia y su constante estímulo, decisivos en la realización de esta Tesis.

A la Prof. Dra. Dña. Juliana Fariña Gonzalez y a la Dra. Paloma Aragoncillo Ballesteros, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de San Carlos, que dirige el Prof. Dr. D. Agustín Bullón Ramírez, por su inestimable colaboración y asesoramiento en el estudio anatómopatológico.

A la Dra. María Luisa Villanueva, del Servicio de Endocrinología Experimental de la Clínica Puerta de Hierro, por su valiosa y eficaz colaboración en la realización del estudio hormonal.

Al Dr. J.F. del Cañizo, por su asesoramiento en la valoración estadística de los resultados y a los Dres. I. Ramos, J. Olmeda y A. Garrido, por su ayuda desinteresada

en la realización de las intervenciones; a todos ellos, compañeros y amigos, vaya mi más profundo agradecimiento.

He de hacer constar asimismo, que toda la metodología quirúrgica se llevó a cabo en el Servicio de Experimentación Animal del Hospital Clínico de San Carlos, que dirige el Prof. Dr. García Partida, quien me brindó la ayuda oportuna, en todo momento.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han colaborado, de una u otra forma, en la realización de esta Tesis, y especialmente, a la Srta. María Antonia Esteban, mecanógrafa de la misma.

# I N D I C E =====

	Pág.
AGRADECIMIENTO.....	4
INTRODUCCION.....	10
-- Concepto de regeneración.....	11
-- Fenómenos observados en tejidos en crecimiento:	
Hipertrofia e hiperplasia celular.....	15
-- Diferentes modelos experimentales empleados en el estudio del proceso de regeneración hepática.....	18
- Derivación portocava.....	20
- Técnicas de trasposición y arterialización.....	27
- Características especiales de la sangre portal..	31
- Autotrasplantes hepáticos.....	34
- Homotrasplante auxiliar hepático.....	40
- Evidencia de un factor humoral que inicia el proceso de regeneración hepática:.....	44
1- Animales sometidos a parabiosis.....	45
2- Animales sometidos a circulación cruzada..	46
3- Efectos del suero de animales hepatectomizados.....	52
-- Sustancias implicadas en el proceso de regeneración hepática.....	54
- Importancia del Glucagón en el proceso de regeneración hepática.....	57
- Glucagón intestinal.....	62
- Mecanismo de acción del Glucagón.....	65

	Pág.
- Importancia de la insulina en el proceso de regeneración hepática.....	71
- Mecanismo de acción de la insulina.....	75
- Otras sustancias implicadas.....	81
-- Situación actual de conocimientos sobre el control de dicho proceso.....	86
-- Estudio del proceso de regeneración hepática....	97
- Alteraciones funcionales.....	99
- Cambios morfológicos.....	101
- Período de Hipertrofia Celular.....	101
- Período de Hiperplasia Celular.....	106
- Cambios bioquímicos:.....	110
- Síntesis Proteica.....	111
- Síntesis de RNA .....	113
- Síntesis de DNA.....	116
- Poliaminas en regeneración hepática.....	120
- Iniciador del proceso de regeneración hepática.....	125
-- Citocromo P <sub>450</sub> .....	132
-- Retículo endoplásmico hiperactivo e hipoactivo..	135
-- Lisosomas: Papel de estos orgánulos en el proceso de regeneración hepática.....	139
-- Fosfatasa Acida Lisosomal.....	145
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	148
PLANTEAMIENTO.....	154

	Pág.
MATERIAL Y METODOS.....	159
-- Metodología General.....	161
-- Determinaciones Hormonales.....	164
- Análisis radioinmunológico del Glucagón.....	164
- Análisis radioinmunológico de la Insulina....	171
-- Determinaciones Bioquímicas.....	173
- Determinación de Citocromo P <sub>450</sub> .....	174
- Determinación de Fosfatasa Acida.....	176
- Valoración de Proteínas.....	176
- Extracción de Lípidos.....	178
- Valoración de Fosfolípidos.....	179
-- Estudio Anatomopatológico.....	182
- Optico.....	182
- Ultramicroscópico.....	183
RESULTADOS.....	186
-- Evolución de los animales.....	187
-- Determinaciones Hormonales.....	191
- Glucagón.....	191
- Insulina.....	196
- Determinaciones Bioquímicas.....	201
1- Fracción microsomal.....	201
- Citocromo P <sub>450</sub>	
- Proteínas	
- Lípidos totales	
- Fosfolípidos	

2- Fracción mitocondrial.....	213
- Fosfatasa Acida	
- Proteínas	
-- Valoración conjunta de los resultados.....	220
-- Estudio Anatomopatológico.....	225
- Optico.....	228
- Ultramicroscópico.....	235
DISCUSION.....	272
RESUMEN.....	298
CONCLUSIONES.....	304
BIBLIOGRAFIA.....	308



**I N T R O D U C C I O N**  
=====

#### CONCEPTO DE REGENERACION

Dicho término se utiliza para designar el proceso que tiene por finalidad la restauración de un órgano o tejido determinado y que se manifiesta fundamentalmente mediante la producción de nuevas células.

El hígado, riñón, páncreas y otros órganos, son capaces de reparar las pérdidas tisulares producidas por agresiones quirúrgicas, químicas, físicas, metabólicas e infecciosas.

Refiriéndonos concretamente al hígado, Ponfick <sup>1</sup> observó este fenómeno en perros, en 1894. Posteriormente, esta propiedad del hígado para reparar sus pérdidas ha sido confirmada en otras especies, <sup>2,3,4,5</sup> incluido el hombre <sup>6,7,8,9,10,11</sup>.

Aunque dicho proceso puede ser inducido mediante diversos procedimientos, <sup>12,13</sup> así como formando parte de la reacción de este órgano frente a ciertas entidades nosológicas, fundamentalmente de tipo cirrótico, <sup>14,15</sup> y en la fase de recuperación de las hepatitis, <sup>16</sup> el estímulo preferentemente empleado para estudiar el fenómeno regenerativo hepático ha consistido en la resección quirúrgica de una parte sustancial de éste, siendo la rata el animal utilizado con mayor asiduidad en este tipo de investigaciones.

Si bien el concepto de regeneración conlleva en principio una restauración de la estructura anatómica original, como sucede en el proceso de reparación de la cola y miembros de algunos anfibios;<sup>17</sup> después de efectuar una hepatectomía parcial, el hígado alcanza aproximadamente su peso anterior, mas no reproduce su estructura anatómica original; en otras palabras, si se extirpan varios lóbulos, los restantes aumentan en peso y tamaño, pero no se forman otros nuevos.<sup>1,2</sup>

Así pues, la restauración hepática podría ser referida más bien a una hiperplasia antes que a un proceso regenerativo; no obstante, dicho término es tan expresivo, que se ha introducido plenamente en la literatura, siendo aceptado unánimemente por todos los autores que han investigado este fenómeno.

En cuanto al tiempo empleado en la restitución tisular, oscila enormemente según las diferentes especies, siendo en la rata de unos 10 a 20 días,<sup>2,18,19</sup> en el perro de 6 a 8 semanas<sup>19</sup> y en el hombre, por término medio, de unos 6 meses, variando en este último según los diferentes autores desde 2 meses<sup>9</sup> a 2 años.<sup>10</sup> aunque existe unanimidad de criterio en convenir que la mayor parte de la restauración se efectúa en unas 6 semanas, tiempo en el que se normalizan los parámetros metabólicos sensiblemente alterados en las grandes resecciones hepáticas.<sup>8,20,21</sup>

No obstante, el tiempo empleado en la restitución tisular y las características de la respuesta proliferativa dependen de múltiples circunstancias, entre las que destacan principalmente la edad,<sup>23</sup> y la cantidad de parénquima reseca<sup>22,24</sup>. Estos factores, así como los parámetros utilizados en cada caso explican quizá los diferentes períodos de tiempo referidos por los diversos autores.

Como podrá observarse a lo largo de esta exposición, el fenómeno que nos ocupa es extremadamente complejo, cualidad que puede desprenderse del hecho de que el proceso regenerativo afecta tanto a los hepatocitos como a los restantes tipos de células que alberga el hígado (células sinusoidales, epiteliales de los conductos biliares y células del tejido conjuntivo hepático). Las células sinusoidales (células de Kupffer, células CALP y células endoteliales) suponen un 35'8% del total, correspondiendo a los hepatocitos un 60'2%, según Fabrikant<sup>25</sup>.

Así pues, el control y la ordenación armónica del crecimiento de las diferentes estirpes celulares, ha de ser en principio extremadamente complejo.

Por otra parte, los estudios encaminados a desvelar el mecanismo íntimo del proceso de regeneración hepática han encontrado serias dificultades, debido en gran parte:

- 1) A la doble irrigación hepática (arteria hepática y vena porta).

2) A la situación de dicho órgano, que le permite recibir a través del sistema portal todo el efluente sanguíneo esplácnico, el cual vehícula, entre otras sustancias, gran cantidad de hormonas (gastrointestinales y pancreáticas) y nutrientes.

Estos hechos originan grandes problemas a la hora de interpretar los resultados obtenidos en los diferentes modelos experimentales, en cuanto a la valoración de las diversas sustancias hipotéticamente relacionadas con dicho proceso. Debido a estas consideraciones, permanecen aún múltiples interrogantes sin encontrar la respuesta adecuada, a pesar del ingente material acumulado en las últimas décadas.

Sin embargo, podemos convenir actualmente que el control de la regeneración hepática es de tipo extracelular o humoral por múltiples razones que analizaremos posteriormente, destacando entre estas, dos muy importantes:<sup>26</sup>

1) La división celular se observa de forma difusa, en la totalidad del parenquima hepático.

2) El proceso regenerativo se detiene cuando la masa hepática es restaurada sin producirse un exceso de la primariamente existente.

FENOMENOS OBSERVADOS EN TEJIDOS EN CRECIMIENTO:

HIPERTROFIA E HIPERPLASIA.

Dos fenómenos que suelen ir asociados generalmente, contribuyen al crecimiento de un tejido: la hiperplasia y la hipertrofia. Estos términos son definidos respectivamente como un incremento en el número y tamaño celular.

Como hemos expuesto anteriormente, la regeneración de un órgano o tejido es referida a la formación de nuevas células, las cuales son similares a aquellas originalmente presentes antes de la agresión desencadenante; sin embargo, la hiperplasia que caracteriza a un tejido en regeneración se asocia con un aumento del tamaño de éstas y en la mayor parte de los mamíferos, la división celular va precedida de un aumento del tamaño celular.<sup>27</sup>

De esta forma, el proceso regenerativo normalmente abarca dos períodos sucesivos:

1) Período de hipertrofia celular: determinado fundamentalmente por incremento de la síntesis protéica y de RNA.

2) Período de hiperplasia celular: determinado por síntesis de DNA y producción de mitosis, observándose éstas últimas a partir de las 24 horas siguientes a la aplicación del estímulo desencadenante.

Se ha discutido reiteradamente la relación existente entre estos dos fenómenos y, concretamente, la significación de la hipertrofia celular como paso obligado en la síntesis de DNA y la producción de mitosis.

Así, Johnson <sup>28</sup> opina que esta secuencia de fenómenos podría explicarse mediante una original hipótesis que Mazia <sup>29</sup> ha denominado " Teoría de la Masa Crítica ", según la cual, las manifestaciones de hiperplasia celular se producirían cuando la célula alcanza un determinado tamaño, que ocasionaría quizá un desequilibrio en la relación núcleo/citoplasma. A este respecto, es típica la observación de que la división de una ameba puede ser pospuesta indefinidamente mediante amputaciones repetidas de su citoplasma que impedirían quizá, que alcanzase una determinada "masa crítica", según dicha hipótesis.

Si bien el propio Johnson ha aportado ciertos cálculos matemáticos predictivos que parecen guardar una estrecha correlación con el desarrollo del proceso regenerativo en el ratón, basándose en esta teoría; existen, por otra parte, datos significativos que parecen invalidar dicha hipótesis:

- 1) La posibilidad de observación aislada en ciertas circunstancias de los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia <sup>27</sup>.

- 2) La posibilidad de constatar fenómenos hiperplásicos coexistiendo con atrofia celular, hecho observado después de asociar una hepatectomía parcial a una fístula

de Eck,<sup>31,32</sup> así como una hepatectomía parcial en un hígado en el que previamente se ha inducido una atrofia marcada de un lóbulo al privarle de su riego portal.<sup>33</sup>

Así, bajo estas circunstancias, se ha podido apreciar que las células hepáticas, aún sin llegar a alcanzar en ningún momento el tamaño del hepatocito normal en condiciones basales, son capaces no obstante, de exhibir al igual que aquellos, síntesis de DNA y producción de mitosis.

Se podría convenir pues, que la hipertrofia e hiperplasia celular son fenómenos independientes, que responden en principio a diferentes estímulos, aunque generalmente puedan observarse asociados en el proceso de regeneración hepática, precediendo la hipertrofia celular al fenómeno hiperplásico en condiciones normales.



DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO  
DEL PROCESO DE REGENERACION HEPATICA.

Existe abundante bibliografía, bien relacionada directamente con el tema que nos ocupa, o encaminada a otros estudios sin relación "a priori" con dicho fenómeno, pero que han aportado sin embargo, valiosos datos acerca del proceso de regeneración hepática y los factores implicados en su manifestación.

Si bien en gran parte de los modelos experimentales efectuados, aparecen diversos procedimientos de forma combinada, así como asociación de diferentes técnicas con el estímulo regenerativo habitual (resección de una parte sustancial de la masa hepática), en orden a lograr una mayor claridad expositiva y un estudio comparativo más profundo de los resultados obtenidos por los diferentes autores, serán analizados en diversos apartados, atendiendo al principal procedimiento empleado.

Así mismo, se procurará en la medida de lo posible, ofrecer una visión evolutiva de las diferentes teorías que han sido emitidas para explicar dicho fenómeno y otro hecho que ha venido correlacionándose insistentemente con aquel: la atrofia hepática instaurada después de la derivación de la sangre portal.

Por último, con el fin de no caer en la reiteración, renunciaremos por el momento a la exposición de otros modelos experimentales, más concretamente relacionados con diferentes sustancias implicadas en el proceso de regeneración hepática, que posteriormente serán analizados.

Con arreglo a estos condicionamientos, estudiaremos sucesivamente los siguientes apartados:

- Derivación portocava.
- Técnicas de Trasposición y Arterialización.
- Características especiales de la sangre portal.
- Autotrasplantes hepáticos.
- Homotrasplante auxiliar hepático.
- Evidencia de un factor humoral que inicia el proceso de regeneración hepática:
  - 1.- Animales sometidos a parabiosis.
  - 2.- Animales sometidos a circulación cruzada.
  - 3.- Efectos del suero de animales hepatectomizados.

#### DERIVACION PORTOCAVA

Nicolai Eck, cirujano ruso, demostró por vez primera en 1877 que era factible la práctica de un shunt portocava y que un animal podía ser capaz de sobrevivir a la derivación de la sangre portal a la circulación sistémica, sorteando el hígado. <sup>34</sup>

Antes de sus trabajos, se aceptaba, con base en estudios en los que se había realizado aisladamente una ligadura de la vena porta, que el cese de la perfusión portal al hígado era rápidamente fatal. El interés de dicho autor por este problema, respondía a un intento de desarrollar un proceder terapéutico eficaz para el tratamiento de la ascitis. Su procedimiento quirúrgico recibió el nombre de " Fístula de Eck " y ha sido la base de innumerables modelos experimentales y procedimientos terapéuticos clínicos.

Unos años después, Hahn <sup>35</sup>, trabajando en el laboratorio de Pavlov, describe en perros sometidos a Fístula de Eck, un cuadro denominado " Síndrome de Intoxicación por carne ", por su similitud con aquel que se producía en animales alimentados con grandes cantidades de proteínas, y que consistía en anorexia, pérdida de peso, atrofia hepática y síntomas neurológicos, desembocando en la muerte de dichos animales.

Con base en estos experimentos, se comenzó a especular sobre la importancia de la sangre portal para el mantenimiento de una función hepática satisfactoria.

Trabajos posteriores han confirmado estos efectos perjudiciales de la derivación portal sobre el funcionamiento hepático <sup>32,36,37,38</sup>. También existen datos que permiten sugerir que las alteraciones producidas por la derivación portocava sobre este órgano, serían debidas no sólo a la pérdida del flujo que representa la sangre portal, sino también a unas especiales características de ésta. Así, se ha podido demostrar que cerdos sometidos a una Fístula de Eck pura, mueren en los primeros seis días del postoperatorio más, si se preserva el flujo de la vena pancreático-duodenal al cabo hepático portal, la supervivencia es superior al año <sup>39,40</sup>, hecho que no cabe explicar por cambios simplemente hemodinámicos, ya que el flujo de este afluente es escaso.

A nivel clínico, los trastornos ocasionados por el shunt portocava han sido reiteradamente constatados, destacando la llamada encefalopatía portocava <sup>36,41,42,43</sup> y la atrofia hepática progresiva <sup>44,45,46</sup>, observadas en gran número de pacientes sometidos a este procedimiento, circunstancias que han producido un descrédito de este tipo de derivación y el desarrollo de técnicas llamadas "Selectivas" (derivación esplenorrenal selectiva <sup>47,48,49</sup>, shunt coronariocava <sup>50,51,52</sup>) y otros tipos de derivación que preservan, al menos en parte, el flujo hepático portal (shunt mesocava en "H" <sup>53,54</sup>) así como una resurrección de las técnicas que no afectan la hemodinámica hepática y cuyo fundamento consiste en la desconexión ácigoportal. <sup>55,56</sup>

Volviendo al terreno experimental, Mann y Magath <sup>57</sup> comunicaron en 1922 que la capacidad de regeneración hepática era prácticamente nula después de haber efectuado una fístula de Eck. Esta afirmación fue sustentada posteriormente por las observaciones del propio Mann <sup>58,59</sup>, Stephenson <sup>60</sup> y Mannix <sup>5</sup>. Sin embargo, los trabajos de Child <sup>61</sup> y Fisher <sup>62</sup> no confirmaron esta supuesta preponderancia de la sangre portal respecto a la capacidad de restauración del parénquima hepático. Estos autores efectuaron respectivamente una trasposición portocava y una arterialización del cabo portal, combinadas ambas con una hepatectomía parcial, llegando ambos a la conclusión de que lo importante era la preservación de un flujo hepático aceptable, no otorgando importancia a las hipotéticas cualidades de la sangre portal. Asimismo, Fisher <sup>62</sup> pudo correlacionar directamente la respuesta regenerativa con la cantidad de flujo recibida a través del muñón portal arterializado.

Por último, diversos autores han podido demostrar que puede existir regeneración hepática en ausencia de sangre portal. <sup>26,31,32</sup>

Así, Fisher <sup>32</sup> ha observado que la asociación de una fístula de Eck y una hepatectomía parcial, practicada en el mismo tiempo operatorio o bien cuatro semanas más tarde de la derivación, va seguida de una respuesta proliferativa con síntesis de DNA, producción de mitosis y aumento del volumen hepático, si bien estos fenómenos no llegan a ser tan acusados como en los animales no sometidos a fístula de Eck.

Razona este autor que si la derivación portosistémica ocasiona una atrofia del parénquima con pérdida de volumen de dicha víscera, no parecería razonable esperar el mismo índice de regeneración de la masa hepática que en animales no sometidos a este procedimiento, por lo que encuentra improcedentes las conclusiones de Mann <sup>58,59</sup>, Stephenson <sup>60</sup> y Mannix <sup>5</sup>, los cuales basaban sus consideraciones en los resultados comparativos de la masa hepática en animales normales y en los sometidos a derivación.

Quizá sería conveniente puntualizar que el propio Fisher, en investigaciones posteriores <sup>63,64</sup> llega al convencimiento de que existe un factor vehiculado por la sangre portal (P.B.F.) que es capaz de estimular a los hepatocitos en orden a la regeneración del parénquima y sugiere, en un intento de conciliar esta hipótesis con el hecho de que el parénquima hepático sea capaz de regenerarse a pesar de efectuar un shunt portocava, que dicho factor no se destruiría ni eliminaría en la sangre sistémica, ejerciendo su efecto al recircular nuevamente a través del hígado. <sup>64,65</sup>

Así pues, se ha podido comprobar que los perros sometidos a fístula de Eck presentan una degeneración grasa y una marcada atrofia del parénquima hepático, con ostensible deterioro de las funciones hepáticas, desembocando en la muerte de estos animales en el espacio de varios meses. Por otra parte, la experiencia clínica, ha puesto de manifiesto el frecuente desarrollo de encefalopatía y un

fracaso hepático inmediato o progresivo en los pacientes sometidos a este tipo de intervención, que hicieron proclamar a Varay <sup>66</sup>, que "una buena anastomosis era aquella que no funcionaba demasiado bien".

El deterioro hepático, que a su vez es señalado como uno de los factores productores de encefalopatía, y cuyo sustrato morfológico es una atrofia evidente de dicho órgano, ha sido relacionado con el proceso regenerativo hepático, habiéndose reunido una extensa información en cuanto a la influencia del aporte sanguíneo portal sobre ambas cuestiones.

En este sentido, se han enunciado diversas hipótesis para explicar la atrofia hepática postshunt y la posible influencia de la sangre portal en la regeneración de dicho órgano:

1) La sangre portal tendría unas características especiales, debidas a un incremento de la tensión de oxígeno. Esta posibilidad ha sido considerada <sup>67</sup>, enfatizándose su importancia en el proceso de regeneración hepática, en base a la existencia de las anastomosis arteriovenosas descritas por Spanner en las paredes intestinales del cerdo; no obstante esta hipótesis no ha podido ser comprobada en recientes trabajos de Herrmann, <sup>68</sup> que han puesto de manifiesto la existencia de una mayor concentración de oxígeno y menor de CO<sub>2</sub> en la sangre sistémica que en la portal.

2) Las alteraciones producidas por el shunt portocava serían debidas a la acusada reducción del flujo hepático que dicha técnica conlleva; a este respecto, se calcula una relación de flujo entre la vena porta y la arteria hepática del orden de  $2/1$ <sup>69</sup> a  $3'5/1$ <sup>70</sup>, según autores. El hígado pues, sufriría un menoscabo importante de su vascularización al ser privado de la sangre portal, que abocaría al fracaso de este órgano.

No obstante, se ha comprobado, tanto a nivel clínico como experimental, que la arteria hepática aumenta extraordinariamente su flujo en estas circunstancias; asimismo, a nivel clínico, dicho fracaso hepático es directamente proporcional al aporte sanguíneo portal en cada sujeto. Así, los pacientes en los que la presión portal libre (P.P.L.)- obtenida restando la presión en el lado hepático de la presión en el lado esplácnico, mediante oclusión del tronco portal- es menor o de signo negativo, toleran mejor la derivación<sup>71</sup>, pues exhiben un flujo hepático compensatorio a través de la arteria hepática que ha ido aumentando gradualmente y amortigua en gran parte los efectos del shunt<sup>43</sup>.

3) Se han efectuado multitud de trabajos aparte de los ya citados, relacionando directamente el shunt portocava con la regeneración hepática y otros procedimientos que iremos mencionando sucesivamente para no caer en la reiteración. No obstante, debemos ya anticipar la importancia de estas



observaciones que han sido quizá definitivas en cuanto al tercer hipotético punto de que la sangre portal vehicularía un factor o factores que tendrían decisiva influencia en la conservación del parénquima hepático y que desempeñarían un importante papel en el proceso regenerativo de dicho órgano.

Quizá la abundante investigación sobre los efectos del shunt portocava habría que referirla a la frecuencia en la actualidad de pacientes cirróticos portadores de un síndrome de hipertensión portal y a la realización de gran número de derivaciones de este tipo desde que Whipple <sup>72</sup> y Blakemore <sup>73</sup> incorporaron a la clínica este procedimiento terapéutico.

#### TECNICAS DE TRASPOSICION Y ARTERIALIZACION

En 1953, Child <sup>61</sup> efectuó una trasposición portocava en perros; este procedimiento tiene por consecuencia la irrigación hepática por la sangre vehiculada por la cava inferior. Dicho autor, pudo observar que este gesto eliminaba en gran parte los efectos nocivos del shunt portocava. A conclusiones similares llegó Silen <sup>74</sup>.

Ono <sup>75</sup>, efectuando trasposición portarrenal, comprueba una supervivencia en buenas condiciones así como conservación de los parámetros bioquímicos e histológicos, en un estudio comparativo respecto a los animales sometidos a fístula de Eck.

Por otra parte, se ha podido constatar un efecto beneficioso de la neurectomía periarterial en animales sometidos a este último procedimiento <sup>76</sup>, ya que es capaz de incrementar el flujo arterial en un 132%, resultando un flujo hepático total de un 88% con relación a los animales sometidos a derivación portosistémica solamente. Mas dicho efecto se mantuvo únicamente de cuatro a seis semanas, acompañándose sin embargo de una función hepática normal.

Con base en los beneficiosos efectos sobre el hígado, del incremento del flujo producido por las técnicas anteriormente descritas, se ideó la vascularización del muñón portal secundario a una derivación portocava, anastomosando a éste diferentes ramas arteriales, con el fin de reparar en

parte la pérdida del caudal sanguíneo sustraído al hígado. Se han utilizado con esta finalidad diferentes arterias de la economía: gastroepiploica derecha <sup>77</sup>, esplénica <sup>78</sup>, renal derecha <sup>79</sup>, e injertos venosos desde la aorta <sup>80</sup>.

Con estas técnicas de arterialización del muñón portal se ha comunicado una prolongación de la supervivencia con relación a animales sometidos a fistula de Eck pura <sup>81</sup>, así como una mayor tolerancia a la sobrecarga amoniacal <sup>82</sup> y finalmente, Fisher <sup>62</sup> ha observado una buena capacidad de regeneración hepática en dichos animales; también se ha observado menor pérdida de peso y mayor normalidad de los parámetros bioquímicos en relación al otro grupo <sup>79</sup>, mas todos estos datos se han visto empañados por la aparición de fibrosis portal y zonas de necrosis e infiltrados de polimorfonucleares en los espacios porta así como dilatación de las venas intrahepáticas portales, con engrosamiento de sus paredes <sup>79</sup>, hechos registrados por otros autores <sup>78,81,83</sup> y atribuidos a la mayor presión sistémica que actúa sobre las venas portales intrahepáticas, sometidas habitualmente a una presión sensiblemente menor <sup>83</sup>, de ahí que se haya propuesto efectuar dicho procedimiento con arterias de pequeño calibre <sup>77</sup>; así, Adamson <sup>77</sup> practicó arterialización portal, utilizando la gastroepiploica derecha en 7 pacientes cirróticos con síndrome de hipertensión portal, pudiendo constatar la ausencia de los efectos nocivos anteriormente descritos, a los seis meses de la intervención.

Fisher, como ya hemos referido, demostró la capacidad de regeneración hepática en animales sometidos a arterIALIZACIÓN de su cabo portal <sup>62,84</sup>, del mismo modo que Child <sup>61</sup> ha observado esta capacidad después de efectuar una trasposición portocava.

El primero de estos, defensor de la " TEORIA VASCULAR ", la cual concede un papel fundamental a la cantidad de flujo hepático total, asoció al shunt portocava en un modelo experimental, la ligadura de la rama de la vena hepática correspondiente a un lóbulo, observando que este gesto prevenía la típica atrofia desencadenada por la fístula de Eck, que se seguía encontrando obligadamente en el lóbulo opuesto <sup>85</sup>; de lo cual deduce dicho autor que la modificación de presiones en el lecho vascular intrahepático produce intensa afectación de dicho órgano; asimismo, según Fisher, la disminución del flujo con enlentecimiento a través del lecho capilar, ocasionaría una mayor extracción de sustancias nutrientes procedentes de la arteria hepática, a cargo de los hepatocitos. Finaliza este autor, argumentando que estos hechos demuestran que la atrofia secundaria al shunt portocava, es debida a cambios de presión en el lecho capilar hepático, dependientes en último término de la disminución del flujo hepático portal.

En conclusión, las técnicas de trasposición y arterIALIZACIÓN, las cuales mantienen un determinado aporte sanguíneo al hígado, a través del cabo portal, previenen

en parte la atrofia hepática desarrollada por la derivación portocava, hecho que apoya la importancia de un adecuado flujo hepático para la homeostasis de este órgano.

#### CARACTERISTICAS ESPECIALES DE LA SANGRE PORTAL

En 1920, Rous y Larimore <sup>86</sup>, apuntaron la posibilidad de que ciertas sustancias vehiculadas por la sangre portal, podrían prevenir la atrofia hepática y promover la regeneración de este órgano; su hipótesis se basó en la existencia de atrofia en un lóbulo hepático subsiguiente a la oclusión de su afluente portal, mientras el otro lóbulo exhibía signos de hipertrofia celular. Esta hipótesis no recibió aportaciones concluyentes en trabajos posteriores <sup>58, 59,60</sup>.

Weinbren, por su parte, ha podido comprobar asimismo, las observaciones de Rous, mas este autor cuestiona la posibilidad de que estas alteraciones sean debidas a las variaciones ocasionadas en el flujo hepático <sup>33,88</sup>; de la misma opinión es Lieberman <sup>89</sup>.

No obstante, Weinbren, en uno de sus últimos trabajos, ha podido apreciar una respuesta hiperplásica discreta en el parénquima hepático privado de su irrigación portal, que atribuye a fenómenos de tipo humoral <sup>87</sup>.

Por otra parte, los estudios de Child <sup>61</sup> y Fisher <sup>62, 85</sup>, anteriormente comentados, inclinaron la balanza hacia la aceptación de la importancia de la cantidad de flujo aportada al hígado (TEORIA VASCULAR) en menoscabo de las hipotéticas cualidades especiales de la sangre portal.

Sin embargo, existen datos que han sido difíciles de rebatir, como el aportado en el clásico trabajo de Hahn<sup>35</sup>. Dicho autor apreció, que el síndrome de intoxicación por carne, descrito por él mismo en perros con fístula de Eck, no se presentaba si se preservaba en el cabo portal el flujo de una rama tributaria de este tronco; observación confirmada por otros autores posteriormente<sup>39,40</sup>.

Starzl, por otra parte, ha podido comprobar que en perros con fístula de Eck en los que se mantiene el aporte sanguíneo de la vena pancreática, se garantizan la homeostasis y la capacidad de regeneración hepática. García Romero<sup>91</sup>, ha observado en estas condiciones que las alteraciones de los parámetros metabólicos son menos acentuadas. Estos datos, unidos a los similares observados en cerdos descritos anteriormente<sup>39,40</sup>, han hecho reconsiderar la importancia de posibles sustancias vehiculadas por la sangre portal. En estos últimos años, los modelos experimentales con homotrasplantes y autotrasplantes hepáticos, han desplazado nuevamente el péndulo de la discusión hacia la tesis que defiende la existencia de dichas sustancias portales, que afectan a la función hepatocelular y a la estructura hepática.

Marchioro<sup>93</sup>, pudo comprobar, en animales sometidos a trasposición portocava parcial, que el lóbulo hepático irrigado con sangre sistémica procedente de la vena cava inferior, exhibía una atrofia marcada mientras que el otro lóbulo, que recibía la sangre portal habitual, adoptaba un

patrón hipertrófico. Este autor conviene en afirmar que la sangre portal posee un efecto beneficioso para el hígado. No cabe invocar aquí como cabría hacerlo en otros trabajos, la influencia de una posible disminución de la cantidad de flujo en el lóbulo atrófico, pues se efectuó medición de este parámetro a través de ambas anastomosis, mediante el empleo de un medidor electromagnético de flujo (M.E.F.); también se efectuó en dos animales arterialización de uno de los lóbulos, permaneciendo el otro como control, pudiéndose observar los mismos efectos. Estos datos, resultan pues discordantes con las investigaciones de Child<sup>61</sup> y Fisher<sup>62,85</sup>, citadas anteriormente.

Desde el punto de vista anatomopatológico, llamaba la atención, además de la atrofia del parénquima, la disminución del glucógeno intracelular, probablemente en relación con la derivación de insulina al otro lóbulo y a la circulación sistémica.

Valgan estos datos como introducción a la cuestión de las hipotéticas cualidades de la sangre portal, que recibirá posteriores aportaciones en sucesivos apartados.



#### AUTOTRASPLANTES HEPATICOS

Se han ensayado múltiples técnicas en el estudio de la viabilidad de los autotrasplantes hepáticos. En un primer momento, se efectuaron reiterados intentos de conservar la viabilidad de fragmentos de tejido, separados totalmente de sus conexiones, incluidas las vasculares. Dichos fragmentos, según la terminología de Dempster y Dunphy<sup>94, 95</sup>, podrían ser considerados como implantes.

Desde la década de los 50 en que Seneviratne<sup>96</sup>, efectuó autotrasplantes parciales en la rata y la posterior descripción de nuevas técnicas<sup>97,98</sup>, se ha desarrollado un importante campo de experimentación del cual han podido extraerse importantes observaciones sobre el tema de la regeneración hepática.

De entre los estudios efectuados, quizá los trabajos de Sigel merecen ser analizados con mayor profundidad. Dicho autor ha desarrollado paulatinamente una importante línea de investigación sobre estos temas.<sup>19,26,27,97,99,100</sup>

En 1960, utilizando el perro como animal de experimentación, describe su técnica de autotrasplante hepático parcial, que denomina "Enteropexia con Hepatoenterostomía" (efectuado en dos tiempos) utilizando un asa desfuncionalizada del intestino delgado<sup>99</sup>. El fragmento trasplantado, que medía aproximadamente unos 3 a 5 cm., perdía tamaño progresivamente, siendo éste la mitad a los dos o tres meses

y la cuarta a la décima parte, según los casos, al cabo de un año, no llegando a desaparecer totalmente en ningún animal sometido a esta técnica. Morfológicamente, el auto-trasplante adoptaba una coloración más oscura y marcada disminución del número de hepatocitos, con condensación del estroma.

Efectuando estudios comparativos de estos animales con un segundo grupo en el que efectúa una hepatectomía parcial <sup>19</sup>, observa que los autotrasplantes de estos últimos animales, tenían mayor tamaño que los controles, aunque también perdían peso y se diferenciaban además en que el número de células conservadas era superior y exhibían un tamaño mayor que el de los controles. Sin embargo, ambos grupos adoptaban ciertas condiciones morfológicas similares:

- 1.- Presencia de gran cantidad de células supervivientes alrededor de los espacios porta.
- 2.- Ausencia significativa de necrosis celular.
- 3.- Mínima degeneración grasa.
- 4.- Mínima fibrosis portal y mínima reacción inflamatoria.

Determinando la proporción de síntesis de DNA <sup>26</sup> utilizando timidina tritiada, pudo observar en los animales hepatectomizados un aumento significativo en ambos tejidos hepáticos (hígado remanente y autotrasplante), que fueron correlacionables en cada animal individualmente. Leong <sup>101</sup> y Virolainen <sup>102</sup>, han obtenido similares resultados en ratas.

Realizando una fístula de Eck <sup>26</sup>, ésta no produjo cambios significativos con arreglo a las cifras normales en cuanto a la producción de síntesis de DNA, tanto en el hígado propio como en el autotrasplante. Por último, la asociación de una hepatectomía parcial con una fístula de Eck, produjo un aumento en la síntesis de DNA superponible al de la hepatectomía parcial únicamente. Este último resultado, confirma las tesis de Fisher <sup>32</sup> y Weimbren <sup>31</sup> en cuanto a que la regeneración puede tener lugar en hígados con una drástica reducción del flujo sanguíneo, hecho que según Sigel <sup>26</sup>, conduce finalmente a la validez de la teoría humoral (pag. 44).

Desde el punto de vista morfológico, llamaba la atención que los hepatocitos marcados con timidina tritiada, como expresión de síntesis de DNA, se localizaban en las áreas periportales <sup>26</sup>.

La hepatectomía parcial a las seis semanas, produjo un aumento significativo en el peso del autotrasplante con relación a los controles, así como al contenido proteico, lipídico y de DNA. La fístula de Eck no produjo elevación alguna de la síntesis de DNA, adoptando los otros parámetros una fórmula similar. Este hecho, según Sigel, pone de manifiesto que la hepatectomía parcial induce una típica respuesta regenerativa con hiperplasia e hipertrofia de los hepatocitos en tanto que la fístula de Eck, produce solamente una hipertrofia celular en dichos autotrasplantes, lo que permite admitir a priori dos mecanismos independientes para la hiperplasia y la hipertrofia. Una evidencia

estadística de dicha independencia, sería la falta de adición de los efectos de la hepatectomía y de la fístula de Eck cuando se ejecutan asociadamente.

Concluyendo, estos datos indican que existen diferentes respuestas celulares hepáticas para diferentes agresiones hacia este órgano, mediadas por diferentes mecanismos humorales que, en última instancia, podrían representar la complejidad y expresión de múltiples reacciones bioquímicas de tipo feed-back, según Sigel.

En otro modelo experimental, en el que se trasplantaba el tejido hepático a nivel del cuello, el mismo autor <sup>100</sup>, pudo observar que la fístula de Eck corregía la atrofia y la pérdida de peso del trasplante, incrementando el contenido proteico y lipídico sin ser significativamente mayor el del DNA, el cual ha mostrado un significativo aumento después de efectuar una hepatectomía parcial.<sup>26</sup> Estos hechos avalan un efecto antiatrófico más que regenerativo de la fístula de Eck sobre los autotrasplantes en estos modelos experimentales. Por otro lado, el efecto de esta técnica sobre el hígado remanente era el de una atrofia del parénquima.

Los cambios ocurridos en el autotrasplante de este último experimento, <sup>100</sup> acontecen en ausencia de sangre portal y sin incremento del flujo sanguíneo, por lo que Sigel interpreta que los cambios producidos por la fístula de Eck en dicho tejido, son debidos a alteraciones en la constitución de la sangre y en último término, a fenómenos de tipo

humoral, en todo caso diferentes a los que desencadena una hepatectomía parcial.

Price <sup>103</sup>, por su parte, utilizando el perro como animal de experimentación, efectuó autotrasplantes de ambos lóbulos izquierdos a nivel de la pelvis así como re-sección de los dos lóbulos centrales; esto último, con objeto de estimular el proceso regenerativo. Según la irrigación del autotrasplante, se distinguieron dos grupos : 1) el autotrasplante recibía su irrigación a través de la vena mesentérica; 2) el autotrasplante recibía sangre sistémica procedente de la cava inferior.

Los animales del primer grupo exhibieron un claro proceso regenerativo, tanto en el autotrasplante como en el hígado remanente; en cambio, los autotrasplantes del segundo grupo presentaban una atrofia evidente a los 15 días de la intervención. En este segundo grupo, el 40% de las anastomosis de la cava inferior con la porta se trombosaron y en estos animales, la atrofia del autotrasplante se instauró con mayor rapidez.

Parece ser pues, que en los modelos experimentales en que se establece un sistema competitivo entre diversos segmentos hepáticos, ciertas sustancias vehiculadas por la sangre portal poseen al menos un papel importante, no solo en el mantenimiento de la función e integridad del hepatocito sino también en el proceso regenerativo de dicho órgano.

Resumiendo, todos estos estudios utilizando auto-trasplantes hepáticos, han puesto de manifiesto que existe un mecanismo humoral implicado en el proceso de regeneración hepática. Asimismo, en el trabajo de Price<sup>103</sup> referido últimamente, la sangre portal parece evidenciar importantes propiedades en cuanto a la homeostasis y la capacidad de regeneración hepática.

#### HOMOTRASPLANTE AUXILIAR HEPATICO

Este tipo de técnicas, descritas por Welch y Goodrich <sup>104,105</sup>, y concebidas en principio para el tratamiento del fracaso hepático secundario a enfermedades no cancerosas, consisten en la práctica de un homotrasplante hepático sin extirpación del hígado del huesped.

Empleando este tipo de procedimientos se ha podido observar que, transcurridas dos semanas, el hígado trasplantado según la técnica original de Welch y Goodrich, comenzaba a experimentar una atrofia importante, aún siendo el huesped tratado con drogas inmunosupresoras. <sup>106,107</sup>

Se han enunciado varias hipótesis para explicar este fenómeno, barajándose entre éstas la posibilidad de que existiera una competición de sustratos nutrientes por parte de ambos hígados. <sup>108</sup> Así, Marchioro y Starzl <sup>108</sup>, diseñaron un modelo experimental destinado a comprobar la importancia de la sangre portal como hipotético vehículo de dichos sustratos, estableciendo una irrigación portal en uno de los hígados, en contraposición con una irrigación sistémica en el otro.

Así, en el primer grupo de animales, el hígado del huesped se encontraba irrigado por la arteria hepática solamente, mientras el homotrasplante recibía la sangre del sistema portal y de la arteria ilíaca izquierda.

En el segundo grupo, el hígado del huesped recibía su irrigación, a través de su propia vena porta, de las

venas esplénica y pancreático-duodenal, mientras que el homotrasplante recibía sangre procedente de la vena mesentérica y de la arteria ilíaca derecha.

En un tercer grupo, efectuó una trasposición portocava de tres a nueve meses antes de la práctica del trasplante, y posteriormente, una ligadura de la vena porta, con lo cual, la sangre procedente de este sistema, bañaba primeramente el hígado trasplantado y después el hígado del huesped por vía de la vena cava inferior. Los seis perros de este último grupo, arrojaron una exigua supervivencia que no permitió contrastar sus resultados.

En el primer grupo, en el que el homotrasplante recibía el efluente portal, los hígados trasplantados alcanzaron mayor peso que el del huesped, a pesar de que los animales donantes eran de menor tamaño. El estudio histológico a los 31 días de la práctica del trasplante, reveló una atrofia centrolobulillar sin infiltración linfoide, acompañados de condensación de la reticulina a nivel centrolobulillar, cambios similares a los descritos por Mann<sup>59</sup> después de efectuar una fístula de Eck. En el homotrasplante se observó, en cambio, un infiltrado linfoplasmocitario sin apreciarse la atrofia anteriormente objetivada.

En el segundo grupo, en el que el homotrasplante recibía sangre a través de la vena mesentérica y el hígado del huesped, sangre gastro-espleno-pancreático-duodenal, los resultados fueron inversos, lo que, según estos autores,



permite afirmar que existen unos requerimientos fisiológicos para el homotrasplante auxiliar hepático y que además se observa un comportamiento competitivo entre ambos órganos por sustancias vehiculadas a través de la sangre portal, en ausencia de la cual, el homotrasplante sufre un proceso atrófico y con cuyo aporte, toma por el contrario una ventaja, desde el punto de vista fisiológico, sobre el hígado del huesped; tesis compartida por Thomford <sup>109</sup>.

Efectuando una crítica a estas investigaciones, se podría argumentar quizá que en el primer grupo de animales, el hígado del huesped sufre un menoscabo importante de su vascularización, hecho que, por otra parte, no parece que pueda influir en la ausencia de atrofia en el homotrasplante con relación a los controles.

En 1971, Fisher <sup>64</sup> ha aplicado las técnicas de homotrasplantes auxiliares hepáticos al estudio de la regeneración hepática en ratas, utilizando proceimientos muy parecidos a los de las investigaciones de Marchioro <sup>108</sup> y ha podido constatar que la observación de fenómenos de tipo regenerativo en los homotrasplantes hepáticos depende fundamentalmente de que estos reciban una irrigación portal en primer lugar antes que el hígado del huesped, siendo por el contrario la regeneración evidente en este último, cuando dicha sangre portal no es derivada hacia el homotrasplante.

Así pues, estos hechos también ponen de manifiesto el control extracelular o humoral de la regeneración hepática y la importancia de la sangre portal en dicho proceso.

EVIDENCIA DE UN FACTOR HUMORAL QUE INICIA EL PROCESO DE REGENERACION HEPATICA.

Ante los postulados de la "TEORIA VASCULAR", una nueva explicación del control del proceso de regeneración hepática, denominada "TEORIA HUMORAL", ha recibido especial atención desde que Christensen y Jacobsen <sup>110</sup> pudieron apreciar un incremento significativo en el porcentaje de mitosis hepáticas en una de las ratas de un par sometido a parabiosis, cuando se efectuaba una hepatectomía parcial en el otro miembro del par.

Estos datos fueron confirmados posteriormente por otros autores <sup>111,112</sup>, interpretándose que la producción elevada de mitosis en el otro miembro del par que conservaba su hígado intacto, sería debida a un cambio en la constitución de la sangre o lo que es lo mismo, a un fenómeno de tipo humoral.

Desde estas primeras experiencias, gran número de trabajos sustentan esta teoría, destacando entre otros los siguientes estudios:

- 1) Animales sometidos a parabiosis.
- 2) Animales sometidos a circulación cruzada.
- 3) Efectos del suero de animales hepatectomizados.
- 4) Los modelos experimentales de autotrasplantes hepáticos y homotrasplante auxiliar hepático descritos anteriormente. <sup>19,26,27,64,97,99,100</sup>

### 1) ANIMALES SOMETIDOS A PARABIOSIS

Desde los trabajos de Christensen y Jacobsen <sup>110</sup>, los resultados obtenidos en experimentos de este tipo han sido contradictorios. Así, Bucher <sup>111</sup>, empleando técnicas similares e incluso en tripletes de animales en parabiosis, e igualmente Wenneker <sup>112</sup> y Allegri <sup>113</sup>, han llegado a las mismas conclusiones, mientras Brauer <sup>114</sup>, Rogers <sup>115</sup> e Islami <sup>116</sup>, no han conseguido apreciar los efectos descritos anteriormente.

Islami, comparando sus datos con los de Bucher, intenta explicar esta discordancia argumentando que en el modelo experimental de éste último, además de efectuar una celioanastomosis <sup>117</sup>, incorporaba una anastomosis a nivel esplénico que probablemente permitiría un mayor intercambio de sangre entre ambos animales.

Posiblemente la causa de esta disparidad de resultados entre los diferentes autores sea debida, como postula Islami, a la cantidad de sangre que se intercambia entre los dos miembros del par pues, como podremos observar en el siguiente apartado, algunos autores <sup>118</sup> asignan una importancia decisiva, en animales sometidos a circulación cruzada, a la cantidad de flujo a través de las cámulas o vasos que posibilitan el intercambio de sangre entre los animales en los que se ha practicado este tipo de técnicas.

## 2) ANIMALES SOMETIDOS A CIRCULACION CRUZADA

Molten y Bucher <sup>118</sup> observaron en 1967, mediante el empleo de circulación cruzada extracorpórea, que al efectuar una hepatectomía parcial en una de las ratas, incrementaba significativamente la síntesis de DNA y el porcentaje de mitosis en el otro animal que conservaba su hígado intacto, guardando el incremento de estos parámetros una correlación directa con la cantidad de parénquima resecado (78%-85%), si bien la hepatectomía del 34% fracasó en incrementar dichas determinaciones.

Alston y Thomson <sup>119</sup>, no pudieron demostrar estos hechos unos años antes, lo cual, como apuntan Molten y Bucher, podría ser debido a ciertas condiciones que variarían significativamente los resultados en este tipo de procedimientos, tales como la edad, cantidad de parénquima resecado, grado de sedación, volumen/minuto a través de las cánulas, duración de la circulación extracorpórea, etc.; puesto que posteriormente, las observaciones de Molten y Bucher han sido confirmadas mediante el empleo de diferentes técnicas de circulación cruzada. <sup>63,120,121</sup>

Así, se ha podido demostrar que es imprescindible un determinado número de horas de intercambio sanguíneo para que se produzcan estos efectos. Molten y Bucher <sup>118</sup> fijan este mínimo en unas 8 horas. Levi <sup>120</sup>, por su parte, obtiene resultados significativos a partir de las 12 horas, con un máximo a las 24, en que terminó su experiencia;

en cambio, no observó incremento de los parámetros citados anteriormente a las 0,6 y 12 horas respecto a los animales controles.

Sakai <sup>121</sup> ha podido observar, en un estudio comparativo entre ratas parabióticas y ratas en parabiosis más circulación cruzada mediante implantación de cánulas en ambas aortas, que en el primer grupo, existía un aumento significativo de los parámetros citados en el hígado del animal parcialmente hepatectomizado pero no así en el intacto del otro animal; sin embargo, en el segundo grupo (parabiosis + circulación cruzada) el incremento fue significativo en ambos animales, si bien más acusados en la rata sometida a hepatectomía parcial.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la cantidad de flujo que se intercambia entre ambos animales en este tipo de investigaciones.

Fisher realizó un shunt portocava término-lateral en ratas con circulación cruzada extracorpórea a las que efectuó, asimismo, hepatectomías parciales de diversa magnitud (70%-86%-100%) en el mismo animal en el que practicaba la derivación, pudiendo apreciar en el grupo en que reseca el 70% del parénquima, que se producía un incremento 15 veces mayor de la síntesis de DNA; provocando, por el contrario, la resección del 85% del hígado una disminución sobre los animales controles (no hepatectomizados).

Estos hechos entran en discordancia con los resultados de Molten y Bucher <sup>118</sup>, encontrándose sin embargo en relación con el sentir de Weinbren <sup>122</sup>, el cual opina que una resección de gran magnitud disminuye la síntesis de DNA, lo que indicaría en última instancia que debe existir una relación entre el hipotético factor humoral que provoca el estímulo regenerativo y el número de células remanentes, capaces de llevar a cabo el proceso de restauración en este órgano.

Por el contrario, el efecto sobre los animales asociados con hígado intacto, estuvo en dicho modelo experimental en relación directa con el porcentaje de parénquima reseñado. Así, el efecto combinado del shunt portocava y la hepatectomía del 70%, produjo un incremento aún mayor de estos parámetros sobre dicho hígado intacto, disminuyéndolos en los animales sometidos a hepatectomía y shunt. La hepatectomía total aumentó todavía más los porcentajes de síntesis de DNA.

Estos datos en el sentir de Fisher, sugieren la existencia de un factor humoral que incrementa la síntesis de DNA en el hígado del otro componente del par y que sería vehiculado por la sangre portal, ya que al efectuar el shunt portocava, aumenta dicha capacidad para la síntesis de DNA en el hígado intacto del otro animal y al efectuar una hepatectomía total, el hipotético factor vehiculado por la sangre portal alcanzaría íntegramente el hígado

intacto del otro componente del par, lo que explicaría el incremento máximo observado en cuanto a la síntesis de DNA.

Sin embargo, Levi <sup>120,123</sup> ha podido comprobar en un modelo experimental de circulación cruzada entre dos hígados aislados con perfusión continua a través de su cabo portal, que existe un aumento de la incorporación de timidina tritiada en uno de los hígados cuando la perfusión se efectuaba con el efluente de un hígado sometido a resección del 70% de su parénquima.

Este hecho sugiere que el hígado sometido a resección es, no sólo la "diana" de un agente humoral, sino también la fuente de su producción, al menos en un sistema de circuito cerrado como el descrito. El mismo autor, especula con la posibilidad de que el estímulo para la producción de dicho factor, pudiera ser una sobrecarga metabólica impuesta a las células remanentes para subvenir las necesidades del organismo.

Levi, buscando una postura conciliadora con los resultados de Fisher <sup>63</sup> anteriormente expuestos, razona que este autor no consideró la posibilidad de que dicho factor humoral fuera producido por el hígado íntegro del animal asociado, sobre el cual actuaría la sobrecarga metabólica impuesta para atender los requerimientos de los dos animales asociados.



Concluye finalmente este autor, sugiriendo la posibilidad de que los pacientes cirróticos podrían tener un nivel de producción elevado de esta sustancia y que la constante estimulación ejercida por ésta sobre la síntesis de DNA, podría exponer a los hepatocitos al peligro de una degeneración neoplásica, hecho que está suficientemente comprobado en la clínica, ya que los enfermos cirróticos presentan una mayor incidencia de hepatomas.

Todos estos estudios sugieren la existencia de un factor humoral mas su naturaleza aún no ha podido ser determinada. Teóricamente, existen al menos dos posibilidades:

- 1.- Un factor estimulante de la regeneración, podría ser puesto en circulación por el propio hígado o cualquier otro órgano en un animal sometido a cualquier estímulo desencadenante del proceso.
- 2.- Un factor inhibidor de la regeneración, podría estar presente en condiciones normales, inhibiendo la síntesis de DNA, desapareciendo éste al incidir el estímulo regenerativo sobre dicho animal.

Otra circunstancia que queda por aclarar, es la preferente distribución de los fenómenos hiperplásicos en las áreas periportales, <sup>25,26,118,124,263</sup> las cuales son, por otra parte, las primeramente expuestas al flujo sanguíneo hepático. En este sentido se ha podido comprobar que existe una mayor disposición de los fenómenos hiperplásicos a

nivel centrolobulillar cuando la dirección de dicho flujo se efectúa en sentido inverso (desde las venas hepáticas) <sup>125</sup>. Este hecho guardaría una relación del agente humoral a través de su paso por el sinusoides hepático, más hablaría a favor de la posibilidad de su producción extrahepática, hipótesis que estaría en total enfrentamiento con los trabajos de Levi. Hay que hacer constar sin embargo, que otros autores niegan esta preferente distribución de la síntesis de DNA y de la producción de mitosis en las áreas periportales. <sup>126,127</sup>.

Existen pues, según la mayor parte de los trabajos referidos anteriormente, pruebas convincentes a cerca de la existencia de un factor humoral que promueve la regeneración hepática, pero muchos otros interrogantes anteriormente discutidos, permanecen aún sin resolverse.

### 3) EFECTOS DEL SUERO EN ANIMALES HEPATECTOMIZADOS

Glinos y Gey <sup>128</sup>, observaron en 1952 que la adición de suero obtenido de ratas hepatectomizadas, estimulaba el crecimiento de fibroblastos en cultivos de tejidos, no teniendo este efecto el de los animales sometidos a falsa intervención. Posteriormente, estos hechos han sido comprobados por Gentile <sup>129</sup> y se han podido constatar los mismos efectos sobre cultivos de hepatocitos de rata <sup>130</sup> y células fetales hepáticas <sup>131</sup>.

Sakai <sup>132</sup>, apreció un incremento de la síntesis de DNA, mediante utilización de timidina tritiada, y un aumento del número de mitosis en cultivo de células hepáticas así como de linfocitos, al añadir suero de ratas hepatectomizadas, sin observarse efecto alguno con suero de animales sometidos a falsa intervención (laparotomía).

Los efectos observados "in vitro" también han sido constatados en estudios efectuados "in vivo". Así, Smythe <sup>133</sup>, en un trabajo comparativo en ratas sometidas a hepatectomía parcial a las que administra suero de ratas normales o bien de ratas asimismo hepatectomizadas, observa un aumento significativo de la incorporación de  $P_{32}$  al DNA y del índice de mitosis en el segundo grupo con relación al primero. Asimismo, el suero de ratas hepatectomizadas produce incremento significativo de la síntesis de DNA y mitosis en animales no sometidos a resección hepática.

Existe pues, como podemos observar, unanimidad entre las diversas investigaciones de este tipo, sugiriendo la existencia de un factor humoral íntimamente vinculado al proceso de regeneración hepática.

SUSTANCIAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE REGENERACION  
HEPATICA.

Desde los trabajos de Eck <sup>34</sup> y Hahn <sup>35</sup> y la comprobación clínica de las alteraciones experimentales producidas por el shunt portocava, así como por los posibles efectos de dicha derivación sobre el proceso de regeneración hepática, que anteriormente han sido discutidos, se ha valorado alternativamente la posibilidad de que estos cambios fueran debidos a la reducción del flujo hepático producida (Teoría Vascular <sup>61,62,85</sup>) o a unas hipotéticas características especiales de la sangre portal, como ya sugirieron Rous y Larimore <sup>86</sup> en 1920.

En estos últimos años, la demostración de la existencia de un factor humoral, que promueve la regeneración en animales hepatectomizados, de probable origen portal según algunos autores, en base a ciertos modelos experimentales de autotrasplantes <sup>103</sup> y homotrasplantes auxiliares hepáticos <sup>64,108</sup> y otras diversas investigaciones que oportunamente serán comentadas, han inclinado la balanza hacia la hipótesis de que la sangre portal poseería un factor o factores antiatróficos que preservan la integridad morfofuncional del hepatocito y que están implicados directamente en el proceso de regeneración hepática.

Si bien está fuera de toda duda que dicho proceso se encuentra bajo un control humoral, la fuente del factor o

factores que lo gobiernan, no ha podido ser desvelada. Se ha sugerido que el origen de este agente podría ser referido a los órganos que desaguan en el territorio portal, teniendo al menos un papel modulador de dicho proceso,<sup>63,64,93,103</sup> pero los modelos previamente expuestos, cuya finalidad era profundizar en el papel desempeñado por la sangre portal, quizá no han distinguido claramente entre los aspectos cuantitativo y cualitativo del flujo hepático, produciendo resultados contradictorios.

En este apartado, procederemos a analizar las diversas sustancias implicadas y fundamentalmente las dos más barajadas y discutidas: el glucagón y la insulina.

Si bien algunas modernas investigaciones parecen excluir a dichas sustancias como el factor o factores que ponen en marcha el proceso regenerativo hepático, lo que sí parece estar fuera de toda duda, en su papel destacado como moduladores de dicho proceso.

Estas dos hormonas, tienen efectos contrapuestos: así, el glucagón es un potente glucogenolítico y gluconeogénico, mientras la insulina tiene un efecto glucogénico, anti-neoglucogénico y antilipolítico. Según esto, la insulina puede ser considerada como una hormona de almacenamiento de energía, mientras, por el contrario, el glucagón es más bien una hormona facilitadora de energía. Parece de suma importancia la regulación del binomio insulina/glucagón para un correcto funcionamiento hepático, siendo consideradas actualmente las células alfa (productoras de glucagón)

y las células beta pancreáticas (productoras de insulina), como una unidad funcional bicelular <sup>134</sup>.

Dejando a un lado estas nociones de fisiología sobradamente conocidas, vamos a pasar a analizar seguidamente los estudios que sustentan la importancia de dichos factores en el proceso de regeneración hepática.

IMPORTANCIA DEL GLUCAGON EN EL PROCESO DE REGENERACION  
HEPATICA.

Basándose en la evidencia de un factor humoral y en las especiales características de la sangre portal expuestas anteriormente, así como en los resultados obtenidos en sus investigaciones con autotrasplantes<sup>103</sup>, Price<sup>135,136</sup> y Witthamore<sup>137</sup> han desarrollado en estos últimos años una importante línea de investigación experimental, utilizando animales sometidos a resección de los diferentes órganos abdominales (animales eviscerados), cuyos resultados han proporcionado datos de inestimable valor a cerca de la regeneración hepática y de la influencia de la sangre portal, y más concretamente del glucagón, en dicho proceso.

En un primer momento, Price<sup>136</sup> pudo observar, en perros sometidos a trasposición portocava y resección del tracto gastrointestinal, páncreas y bazo (tratados pues necesariamente con insulina), que dichos animales presentaban una acusada hepatomegalia y, a nivel microscópico, un aumento de la cantidad de glucógeno almacenado en los hepatocitos. Estas alteraciones desaparecían mediante aporte exógeno de glucagón o también suprimiendo la resección del tracto gastrointestinal, hecho éste, que apoya los datos actuales sobre la existencia de una sustancia de origen intestinal con acciones superponibles a las del glucagón (tema que será comentado posteriormente).



Dicho autor obtuvo una prolongada supervivencia en estos animales que llegó incluso hasta las seis semanas, circunstancia que permitió el ensayo de nuevos modelos experimentales sobre animales eviscerados. Así en 1972, efectúa, en perros sometidos a arterialización portal, un estudio comparativo, teniendo como objetivo principal la síntesis de DNA (utilizando para ello la incorporación de timidina tritiada), entre estos animales y otros sometidos a evisceración abdominal, hepatectomía parcial, combinación de ambas técnicas y administración de glucagón exógeno a este último grupo, así como hepatectomía asociada a pancreatectomía <sup>135</sup>. En este estudio, los perros privados de su páncreas en cualquiera de estos grupos, recibieron un aporte exógeno de insulina (1-1'5 U/k. de peso/día) y se sacrificaron a los 4 días.

Los perros arterializados sometidos a hepatectomía parcial y evisceración o pancreatectomía, exhibieron un aumento de peso hepático y grandes cantidades de glucógeno en las áreas periportales. Los animales eviscerados tratados con glucagón (50 mgr/k. peso/día) presentaban, por el contrario, poca cantidad de glucógeno y apenas aumentaron sus hígados en peso. En cuanto a la síntesis de DNA, se observó que la hepatectomía parcial incrementaba dicha síntesis, mas, si se asociaba con la práctica de evisceración, se producía sorprendentemente un incremento aún mayor, hecho este último, no observado en ratas <sup>138</sup>. La adición de glucagón disminuyó el porcentaje de actividad de DNA a valores aún más bajos que en los animales hepatectomizados.

Así pues, los perros sometidos a hepatectomía parcial y evisceración abdominal, son capaces de exhibir un fenómeno regenerativo evidente, hecho comprobado posteriormente en ratas por Whittemore y Price <sup>137</sup> y por Bucher <sup>138</sup>. Estos datos, según Price, sugieren que la ausencia de factores portales no anula la capacidad hepática de responder al estímulo regenerativo (hepatectomía parcial) con síntesis de DNA lo que apunta al hígado como fuente de producción del factor "disparador" del proceso, como propone Levi <sup>120,123</sup>, o quizá a un órgano extraabdominal.

En otro orden de cosas, habiendo sido demostrada por Sigel <sup>27</sup> la independencia de los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia en sus investigaciones con autotrasplantes hepáticos y apoyándose en los estudios de Marchioro utilizando trasposición portocava parcial <sup>93</sup>, y en los resultados del estudio en análisis, concluye Price que los factores de origen portal tendrían un papel destacado en el control del fenómeno de hipertrofia celular mientras que la hiperplasia estaría mediada a través de factores humorales producidos por el propio hígado, de acuerdo con Levi <sup>120,123</sup>.

González <sup>139</sup> ha observado en ratas sometidas a tratamiento con azatioprina, que como es sabido, inhibe la síntesis de DNA, que la restauración del parénquima hepático se lleva a cabo sin evidente hiperplasia, debiéndose más bien a hipertrofia celular. Se podría admitir pues que la regeneración, en ausencia de factores portales, se

llevaría a cabo con mayor evidencia de hiperplasia y con menor hipertrofia de los hepatocitos que en condiciones normales <sup>135</sup>. En estas experiencias, todos los animales recibieron tratamiento con insulina por lo que los efectos de la administración de glucagón, en ausencia de ésta, no pudieron ser evidenciados.

Continuando su línea de investigaciones en este tipo de animales sometidos a evisceración abdominal, Whittemore y Price <sup>137</sup> efectuaron un estudio comparativo en ratas hepatectomizadas, asociando a este procedimiento una evisceración, con y sin tratamiento con glucagón (0'2 mgr/K. peso/día) y otro grupo de ratas asimismo hepatectomizadas en las que efectuaba además un shunt portocava. En los animales privados de páncreas se efectuó igualmente aporte exógeno de insulina (30 U/K. peso/día) que hubo de ser incrementada a unas 50 U/K. peso/día en los tratados con glucagón.

De las determinaciones practicadas, destacaba la determinación de síntesis de DNA cuyo pico máximo acontecía a las 36 horas, apareciendo éste a las 72 horas en los animales que habían sido sometidos a derivación portocava. El grupo en el que se había realizado una hepatectomía parcial y evisceración abdominal mostró un retraso aún mayor del pico de máxima síntesis de DNA, aconteciendo éste a las 96 horas, mas, si se efectuaba un aporte exógeno con glucagón, se corregía parcialmente este retraso mostrando un primer pico de actividad a las 48 horas que incrementaba seguidamente hasta las 72 horas después de la intervención. La

magnitud de esta actividad de DNA fue de la misma intensidad en todos los grupos salvo en el correspondiente a animales eviscerados.

Estos datos demuestran que existe un retraso evidente en la manifestación del proceso regenerativo, utilizando como parámetro la síntesis de DNA, en animales eviscerados y en los sometidos a derivación portocava, y que en los primeros, dicha actividad no llega a exhibir una cuantía normal, retrasándose aún más que en los sometidos a derivación portocava; este hecho, pone de manifiesto que dicho retraso es debido en parte a una disminución del flujo hepático y que probablemente la causa fundamental de dicho fenómeno debería ser referida a la ausencia, en estas circunstancias, de sustancias hepatotróficas vehiculadas por la sangre portal <sup>137</sup>. La segunda conclusión se refiere a la acción restauradora del glucagón respecto a la síntesis de DNA, que lo significa como un agente capaz de modificar, en presencia de insulina exógena, el proceso regenerativo inducido por hepatectomía parcial, en este tipo de animales <sup>137</sup>.

Estos datos parecen entrar en discusión con los resultados obtenidos en perros por Price <sup>135</sup>; no obstante, parece ser este último modelo experimental el más correcto en su planteamiento.

### GLUCAGON INTESTINAL

Sutherland y De Duve <sup>140</sup>, observaron en 1948 que el tracto gastrointestinal del perro poseía cierta actividad glucogenolítica a nivel hepático, al igual que el glucagón, si bien ésta era de menor intensidad que la ejercida por dicha hormona. Posteriormente, otros autores han confirmado estos hechos en diferentes especies, incluido el hombre <sup>141,142</sup> y se ha podido evidenciar, mediante procedimientos de reacción cruzada, que en el tracto gastrointestinal existe una inmunoreactividad similar a la presentada por el glucagón <sup>141</sup>.

Al principio activo responsable de este fenómeno se le ha denominado "glucagón intestinal" y su producción parece ser debida a la absorción de glucosa <sup>134,144</sup>, no influyendo sin embargo la administración de aminoácidos i. v. o intraduodenales <sup>143</sup>.

Unger <sup>144</sup> y Valverde <sup>145</sup> han podido determinar en extractos de yeyuno de perro, mediante cromatografía, dos fracciones diferentes de p.m. 7.000 y 3.500, respectivamente, responsables de la inmunoreactividad similar al glucagón en este tramo del tubo digestivo, teniendo la segunda fracción, no así la primera, un acusado efecto glucogenolítico e hiperglucémico.

Said <sup>146</sup>, por su parte, aisló del intestino del cerdo un polipéptido, denominado Polipéptido Intestinal Vasoactivo (V.I.P.), que posee una potente actividad hiper-

glucemiante, vasodilatadora y estimulante del páncreas exocrino, entre otras <sup>146,147</sup> y cuya estructura bioquímica guarda una estrecha semejanza con las del glucagón y la secretina <sup>146,148</sup>. Desbuquois <sup>148</sup> ha demostrado que este agente hormonal, al igual que el glucagón, aumenta la actividad de la adenil-ciclase en hepatocitos y células grasas.

De todos estos hechos, parece desprenderse la existencia de ciertas sustancias de origen gastrointestinal que exhiben una actividad biológica similar a la del glucagón y que poseen una estructura química muy parecida, las cuales podrían asimismo desempeñar un importante papel en la homeostasis hepática y en el proceso de regeneración de este órgano.

Esta hipótesis es sustentada por ciertos trabajos de Price <sup>135,136</sup>, anteriormente comentados, en los que la conservación del intestino delgado en animales eviscerados amortigua parcialmente los efectos que desencadena la deficiencia de glucagón; así como las experiencias de Starzl <sup>149</sup>, empleando técnicas de trasposición portocava parcial y división esplácnica, en los que la sangre intestinal se muestra más ventajosa para el hígado que la sangre sistémica y que posteriormente comentaremos.

También avalan dicha hipótesis los trabajos de Sakai <sup>150</sup>, el cual aisló del suero de ratas un factor estimulante

de la síntesis de DNA, producido probablemente a nivel de ileon terminal. Por último, Fisher <sup>151</sup> localiza la fuente de los principales factores hepatotróficos a dicho nivel, basándose en los efectos producidos por diversas resecciones intestinales, a diferentes niveles del tracto digestivo, sobre el proceso de regeneración hepática.

#### MECANISMO DE ACCION DEL GLUCAGON

Una posible explicación para la influencia de esta hormona en la síntesis de DNA se ha desprendido de las experiencias de Sutherland y Ralls <sup>155</sup>, las cuales pusieron de manifiesto una acción del glucagón a nivel de los receptores de membrana, afectando su acción a varias enzimas, entre las que destaca la adenil-ciclasa, que cataliza la formación de AMP-cíclico, que, a su vez, actúa como segundo mensajero <sup>152</sup>. (Fig. 1).

También parece alcanzar la acción del glucagón a las fosfodiesterasas, las cuales actúan sobre dicho AMP-cíclico, rompiendo el enlace fosfodiéster <sup>156</sup>.

Aunque la influencia de los fenómenos iniciados a nivel de membrana celular sobre el metabolismo de los lípidos y carbohidratos, ejecutados asimismo por los mensajeros nucleótidos, han sido bien estudiados, por el contrario, la relación entre los efectos a nivel de membrana y los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia celular, consecuencia a su vez de la síntesis de proteínas, de RNA y de DNA, permanece aún sin aclarar.

El AMP-cíclico a su vez, ejerce marcada influencia en la fosforilación de las histonas <sup>157</sup>, mediante la activación de una protein-quinasa específica <sup>158,159</sup>.

Langan <sup>157</sup> ha hipotetizado, basándose en sus experiencias, que el glucagón, a través del AMP-cíclico,



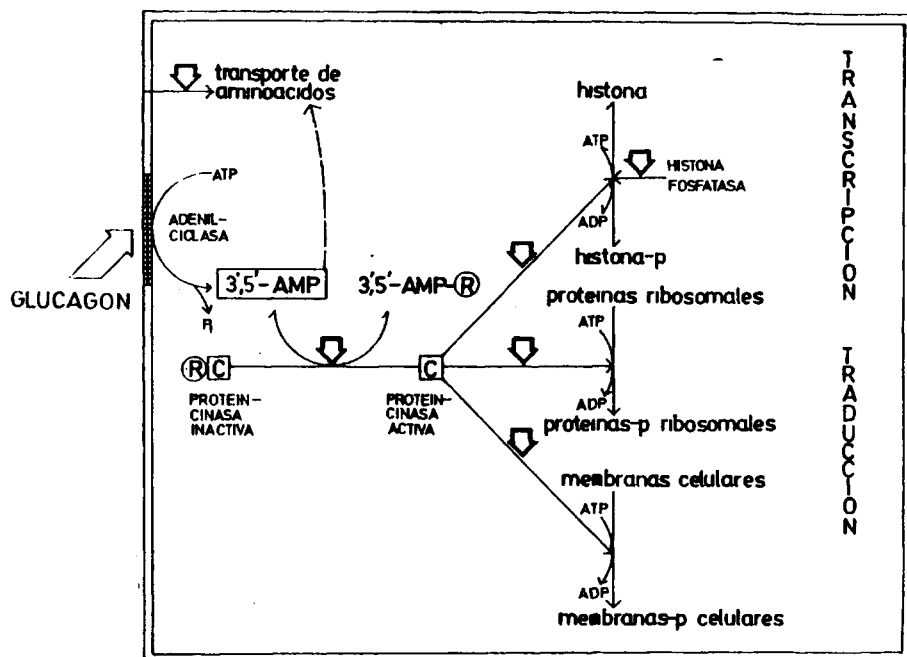


Figura 1

produciría una fosforilación de las histonas, que parece limitarse a una determinada fracción de éstas <sup>157</sup>; dicha fosforilación ocasionaría un cambio en la interacción DNA-histona, con la consiguiente desrepresión de cierta porción del DNA, seguida de la formación de RNA (transcripción) y posteriormente, de síntesis proteica (Fig. 2).

También se ha podido comprobar a este respecto, que el glucagón promueve la síntesis selectiva de dos tipos de proteínas ácidas nucleares (no histonas) <sup>161</sup>, que actúan asimismo como depresores de la unión DNA-histona, produciendo por consiguiente desrepresión del DNA <sup>160</sup>.

Por otra parte, la hiperaminoacidemia estimula la secreción de glucagón <sup>143</sup> y esta hormona parece favorecer la incorporación de aminoácidos por el hepatocito, probablemente por mediación del AMP-cíclico <sup>152,153,154</sup>, aminoácidos que serán necesarios para la síntesis proteica que acompaña al proceso regenerativo.

A la vista de estos datos, se podría sugerir que el papel del glucagón consistiría en la regulación de la fase presintética de los hepatocitos anterior al fenómeno de producción de mitosis.

Evidencias adicionales sostienen la hipótesis de que el glucagón regula la expresión del DNA. Dicho supuesto se basa en trabajos efectuados con hepatocitos fetales, los cuales pueden producir mitosis y maduración de una forma análoga al hígado en regeneración. Así Katoulas y Phillips <sup>162</sup>

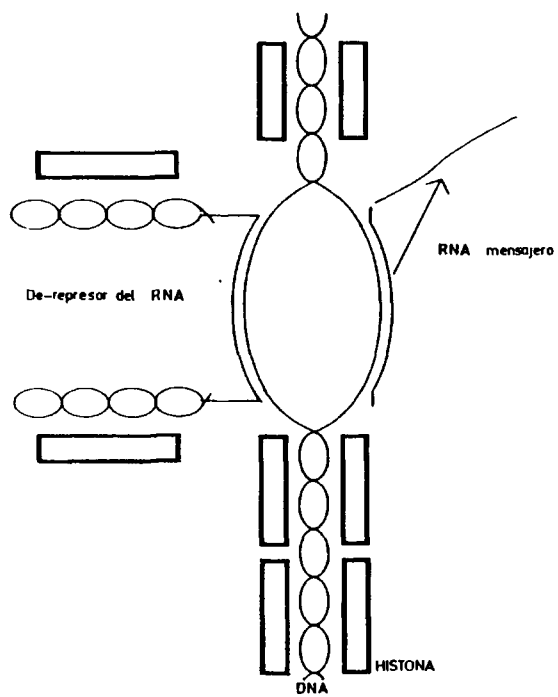


Figura 2

demonstraron que el glucagón acelera la diferenciación celular hepática cuando se administra a ratas recién nacidas. Más recientemente, Chiu y Phillips <sup>163</sup> han podido apreciar que su administración a ratas durante el último período gestacional, produce en los hepatocitos fetales una maduración de los orgánulos celulares (retículo endoplásmico liso, Golgi, lisosomas...) antes del nacimiento, proceso que, en condiciones normales, solamente tiene lugar después de éste.

Esta prematura diferenciación del hepatocito a nivel subcelular, probablemente depende de una información almacenada en el DNA que se expresa en un temprano período ante la presencia de glucagón exógeno.

Asimismo, la administración de glucagón, en combinación con otras sustancias tales como triyodotironina <sup>164</sup>, heparina y ciertos aminoácidos (solución T.A.G.H.), es capaz de inducir síntesis de DNA y producción de mitosis en el hígado de animales que no han sido sometidos a resección quirúrgica parcial de dicho órgano <sup>165</sup>.

Por otra parte, se ha podido observar que el glucagón favorece la formación de lisosomas <sup>162,166</sup> y que estos orgánulos citoplásmicos juegan un importante papel en la diferenciación hepática perinatal <sup>163</sup>, habiendo sido implicadas sus proteasas en la iniciación de la proliferación de los hepatocitos <sup>167</sup>. Este fenómeno, merecerá por su gran importancia un análisis más profundo en otro lugar de esta introducción.

A nivel citoplásmico, los cambios producidos son fundamentalmente el incremento de la síntesis proteica y la biotransformación microsomal, actividades que están localizadas en el retículo endoplásmico rugoso y liso, respectivamente. El incremento del retículo endoplásmico permite el crecimiento en tamaño de las células, es decir, su hipertrofia, que es el resultado bien de una reducción del catabolismo o bien del incremento de la síntesis proteica <sup>168</sup>.

Todos los datos anteriormente expuestos, sugieren, según Whittemore <sup>137</sup>, que el glucagón desempeña un importante papel en el proceso de regeneración hepática, fundamentalmente aplicable a las primeras fases de dicho proceso.

IMPORTANCIA DE LA INSULINA EN EL PROCESO DE REGENERACION  
HEPATICA.

Basándose en los datos recogidos sobre las especiales propiedades de la sangre portal y la influencia de ésta sobre el funcionamiento hepático y su regeneración, obtenidos de las experiencias con homotrasplantes auxiliares de hígado <sup>107,108</sup> y trasposición portocava parcial <sup>93</sup>, Starzl ha profundizado en la búsqueda del hipotético factor hepatotrófico, llegando a la conclusión de que éste es la insulina <sup>107,149,169,170</sup>.

Dicho autor ha podido comprobar, en experimentos con perros sometidos a trasposición portocava parcial (lóbulo derecho irrigado con sangre portal y lóbulo izquierdo con sangre procedente de la cava inferior) y división esplácnica (lóbulo derecho irrigado con sangre pancreato-espleno-gastro-duodenal y lóbulo izquierdo con sangre intestinal), que los lóbulos izquierdos presentaban atrofia y alteraciones morfológicas y en la incorporación de timidina tritiada al DNA, mientras existían signos de hipertrofia e hiperplasia en el lóbulo derecho <sup>149</sup>; también pudo observar alteraciones del metabolismo de los lípidos, referidas a la síntesis de colesterol y triglicéridos <sup>170</sup>.

Por consiguiente, la sangre efluente del páncreas, bazo, estómago y duodeno, parece situar en mejores condiciones funcionales al lóbulo que irriga.

No cabe invocar factores de disminución de flujo en el lóbulo izquierdo en ninguna de las dos experiencias. Es en el segundo estudio donde cabría alguna duda al respecto, mas, Pouyet <sup>171</sup> ha comprobado que el flujo de la vena mesentérica, la cual conduce el efluente intestinal, es mayor que la cantidad de sangre proveniente de los otros órganos esplácnicos.

Al someter a estos animales a un estado diabético producido bien por administración de aloxana o bien por pancreatectomía total, estos lóbulos derechos perdían la ventaja fisiológica adquirida y las diferencias entre ambos lóbulos de los parámetros citados, se acortaban. Obviamente los perros en estado diabético recibieron un aporte exógeno de insulina por administración subcutánea durante los dos meses que duró la experiencia, mas, al valorar el efecto de ésta, hay que tener en cuenta, según Starzl <sup>149</sup>, que su aporte a ambos lóbulos hepáticos lógicamente hubo de sufrir cierto menoscabo debido a los diversos pasos de absorción, dilución, paso a través de la circulación general e incluso a través del lecho capilar.

Las diferencias entre las alteraciones producidas por la diabetes aloxánica y la pancreatectomía total, consistieron en una menor infiltración grasa y menor cantidad de glucógeno almacenado a cargo de la primera, que Starzl atribuye a la acción del glucagón. El hecho de que no existieran diferencias en cuanto a los niveles de los fenómenos de

hipertrofia e hiperplasia, sugiere, según dicho autor, que el factor hepatotrófico más importante es la insulina.

El hecho de que la disminución del peso hepático, de la síntesis de DNA y de otros parámetros fuera más acusada en las trasposiciones parciales que en la división esplácnica, en los lóbulos derechos, induce a pensar que la sangre procedente del tracto intestinal posee ciertas características beneficiosas para el hígado, tesis defendida por otros autores <sup>146,150,151</sup>.

El propio Starzl, haciendo crítica a su modelo experimental, reconocía que no se habían efectuado resecciones hepáticas que seguramente aportarían datos más concluyentes. Así, en un trabajo posterior, asoció este gesto <sup>169</sup>, efectuando hepatectomías del 60% y 30% en el modelo experimental descrito, observando que en los perros no diabéticos, los signos de hipertrofia e hiperplasia fueron mayores en los lóbulos derechos si bien los izquierdos también participaban del proceso regenerativo, aunque en proporción inferior. Es interesante destacar que los lóbulos izquierdos exhibían asimismo, mejor aspecto morfológico que en el estudio anterior, en el que no se habían efectuado resecciones hepáticas.

La producción de una diabetes en estos animales determinó una marcada inhibición de la respuesta regenerativa en ambos lóbulos, que fue más acusada si se omitía el tratamiento con insulina.



Estos datos, permiten pues argumentar la participación de factores vehiculados por la sangre portal en el proceso de regeneración hepática y asignar un innegable papel a la insulina en dicho fenómeno.

En otro tipo de experimentos, se ha observado que infusiones no hipoglucémicas de insulina a nivel de la rama portal izquierda, en animales sometidos a fistula de Eck, corrige en gran parte, en el lóbulo izquierdo, la atrofia hepática y la disminución del índice de mitosis desencadenadas por la derivación de la sangre portal; la administración de glucagón, en cambio, no tuvo estos efectos <sup>172,173</sup>.

Por otra parte, Bucher <sup>174</sup> ha podido comprobar que la administración de suero anti-insulina disminuye la síntesis de DNA en ratas hepatectomizadas.

El papel de esta hormona, produciendo crecimiento y replicación en otras clases de células, ha sido establecida por Lieberman y Ove <sup>175</sup>. Leffert <sup>176</sup>, por su parte, ha observado importantes variaciones respecto a la síntesis de DNA en cultivos de hepatocitos, según la adición o supresión de insulina, entre otras hormonas, y Richman <sup>177</sup> ha podido apreciar síntesis evidente de DNA en cultivos de hepatocitos mediante la adición de insulina, fenómenos comprobados "in vivo" por Younger administrando dicha hormona en estados insulinoprivos, producidos por aloxana <sup>178</sup>.

#### MECANISMO DE ACCION DE LA INSULINA

Esta hormona, al igual que el glucagón, actúa a nivel de los receptores de membrana celular <sup>179,180,181</sup>. No se conoce actualmente con claridad el mecanismo de acción de este agente hormonal, pero las acciones de la insulina parecen ser ejecutadas desde la membrana mediante la acción de los nucleótidos mensajeros, como en el caso del glucagón.

Cuatrecasas <sup>184</sup>, ha podido demostrar en membranas de hepatocitos, que la insulina inhibe la actividad de la adenil-ciclase estimulada por el glucagón, epinefrina y fluoruro sódico así como la actividad de dicha enzima en células grasas, estimulada por epinefrina y corticotropina. Dicha inhibición es detectada a concentraciones fisiológicas de insulina (5-50 microU/ml). A concentraciones superiores (200 microU/ml) desaparece dicho efecto inhibitorio e incluso se observa una estimulación de la actividad de la adenil-ciclase; sin embargo, la insulina no inhibe la actividad de dicho enzima en condiciones basales <sup>184</sup>, mas, ha podido comprobarse una disminución de la concentración de AMP-cíclico en hepatocitos <sup>185</sup> y en células grasas <sup>187</sup>, en presencia de glucagón y estos cambios podrían estar correlacionados con alguno de los efectos biológicos de la insulina en estos tejidos.

Actualmente se conoce la existencia de otro nucleótido mensajero, el GMP-cíclico, que se encuentra en mucha menor cantidad que el AMP-cíclico y que parece actuar como antagonista de éste <sup>182,183</sup>. A este respecto se ha podido observar que dos potentes agentes mitogénicos-fitoheماغلوتينina y concanavalina A-, aumentan en linfocitos los niveles de GMP-cíclico de 10 a 50 veces en el espacio de 20 minutos <sup>182</sup>.

Langan, por su parte ha podido apreciar que la insulina produce, al igual que el glucagón, un aumento de la fosforilación de las histonas <sup>157</sup>. En cambio, Enea no ha podido comprobar síntesis de proteínas ácidas nucleares (no histonas), como produce el glucagón, al administrar insulina <sup>161</sup>.

Revisando la literatura, parecen existir múltiples interrogantes por aclarar en cuanto al mecanismo de acción de la insulina.

Así, no se explica satisfactoriamente su capacidad de fosforilación de las histonas, si disminuye los niveles de AMP-cíclico en presencia de glucagón <sup>185</sup> y se muestra inhibidora de la actividad de la adenil-ciclasa, estimulada asimismo por el glucagón <sup>184</sup>.

Starzl, ha podido apreciar en perros con trasposición portocava parcial, que las concentraciones de AMP-cíclico en el parénquima que recibe el aporte sanguíneo esplácnico, exhiben un discreto incremento en comparación al llamativo aumento registrado en el otro lóbulo al

administrar tolbutamida y glucagón <sup>90</sup>. Dicho autor interpreta que este fenómeno es debido a una acción equilibradora de la insulina.

Por otra parte, la actividad de la adenil-ciclasa disminuye en un 50% en el hígado de animales eviscerados, restaurando dicha actividad la administración de insulina; no así la de glucagón <sup>186</sup>.

Estos datos, unidos a los de otros autores <sup>185,187</sup> parecen demostrar que la insulina ejerce de algún modo un control de la actividad de la adenil-ciclasa.

Steiner, propone dos posibilidades como mecanismo de acción de la insulina <sup>366</sup>, mediadas ambas principalmente a través de lo que se ha dado en llamar "segundo mensajero", cuya identidad permanece en discusión.

- 1) Los efectos de la insulina serían mediados solamente a través del segundo mensajero (Fig.3 A)
- 2) La insulina entraría dentro de la célula produciendo directamente diversas acciones biológicas, corriendo las restantes a cargo del citado segundo mensajero ( Fig. 3 B).

Son pues necesarios nuevos estudios para valorar con exactitud su función en el proceso que nos ocupa así como su mecanismo íntimo de acción.

En otro orden de cosas, se ha observado que la insulina parece jugar un destacado papel en el proceso de fosforilación mitocondrial, fenómeno de suma importancia en

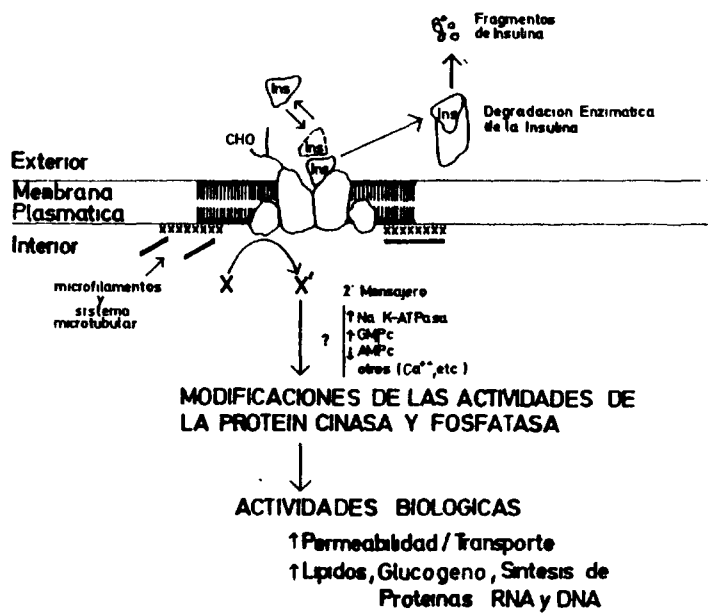


Figura 3 A

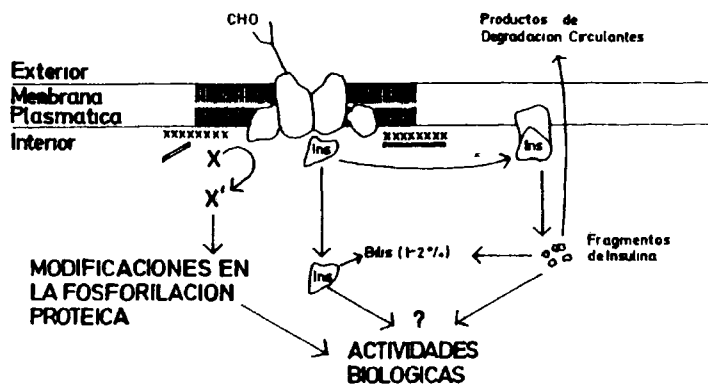


Figura 3 B

la regeneración hepática <sup>188</sup> como fuente de energía en los primeros estadios, así como en un correcto funcionamiento hepático, como ha podido ser comprobado en la clínica, hallando una correlación directa entre el fracaso hepático en pacientes cirróticos y la disminución del citocromo (a<sub>3</sub>) <sup>189</sup>.

Los efectos de la isquemia sobre la función mitocondrial del hepatocito han sido referidos por varios autores <sup>190,191,192</sup>. Recientes estudios de Ozawa <sup>193,194</sup>, a nivel experimental, han objetivado que la ligadura de una rama de la vena porta, duplica la producción de ATP mitocondrial en el lóbulo opuesto, disminuyéndola en un 30% aproximadamente en el lóbulo en el que se efectuó la ligadura de su aferente portal; estos efectos se pueden observar unas 12 horas después de la intervención. La concentración de enzimas mitocondriales permanece normal, resultando pues este incremento en el lóbulo opuesto, de una capacidad mayor en el transporte de electrones.

Asociando a este procedimiento la práctica de una derivación portocava latero-lateral, los parámetros de fosforilación mitocondrial aumentaban en el lóbulo en el que se practicó la ligadura de su aferente portal a niveles practicamente similares al otro lóbulo, siendo estos menores que en los animales sometidos a falsa intervención <sup>194</sup>.

Estos datos sugieren, en el sentir de Ozawa, que la sangre portal juega un papel destacado en la producción

de ATP mitocondrial, pudiendo hipotetizarse la existencia de un factor específico estimulante de la fosforilación mitocondrial de origen portal; sin embargo, no parece tenerse en cuenta, en nuestra opinión, al emitir esta hipótesis, la evidente disminución del flujo hepático producida en un lóbulo con el primer procedimiento y en la totalidad del hígado con el segundo.

El mismo autor, ha comprobado posteriormente que la insulina en dosis de 2'5 U/K. peso/día, en ratas sometidas a ligadura de una de sus ramas principales, restituye los parámetros normales de producción de ATP a los 30 minutos, teniendo un efecto máximo a las dos horas <sup>195</sup>.

Experimentos aún más recientes han confirmado estos efectos de la insulina, no apreciándose ninguna acción del glucagón en esta manifestación metabólica <sup>196</sup>. No obstante, no ha podido demostrarse una elevación de los niveles de fosforilación mitocondrial con la administración de insulina, en condiciones basales <sup>195</sup>.

Resumiendo, la insulina produce un aumento de la síntesis de ATP mitocondrial deprimida con la deprivación de sangre portal, sin embargo, en condiciones fisiológicas, su papel es solamente hipotético, residiendo probablemente el control de este proceso metabólico, fundamentalmente, en la hormona tiroidea <sup>197</sup>.

#### OTRAS SUSTANCIAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE REGENERACION HEPATICA.

Además de la insulina y el glucagón, muchas otras sustancias han sido relacionadas, en mayor o menor grado, con este fenómeno. Algunas son de origen extrapancreático y otras tienen incluso una procedencia extraportal. Su posible actuación en dicho proceso quizá explicaría en parte las discordancias existentes entre las diferentes hipótesis y los diversos resultados arrojados por los diferentes modelos experimentales. Pasamos a describir seguidamente las más destacadas.

Cater <sup>198</sup> observó en 1957, que la STH incrementaba el porcentaje de mitosis así como la síntesis de ácidos nucleicos, en el hígado en regeneración; hecho comprobado posteriormente <sup>18</sup>.

Por otra parte, se ha podido apreciar, en ratas hipofisectomizadas, una disminución del porcentaje de mitosis y un apreciable retraso en la manifestación de dicho fenómeno <sup>18,199</sup>. No obstante se ha objetivado una disminución de STH en sangre después de efectuar una hepatectomía parcial <sup>369</sup>.

Asimismo, parece ser notable la influencia de la somatotropina y, en menor grado, de la hormona tiroidea en la actividad de la ornitina-decarboxilasa <sup>199,296</sup>, enzima fundamental en la síntesis de las poliaminas (pág 120),



sustancias que desempeñan un importante papel en el proceso regenerativo hepático.

Leffert <sup>176</sup>, por su parte, ha asignado a la STH, hidrocortisona y triyodotironina una función destacada como iniciadores o potenciadores de la síntesis de DNA, con base en sus investigaciones, utilizando cultivos celulares hepáticos. Por otra parte, las hormonas corticoideas aisladamente, parecen tener un efecto negativo sobre la multiplicación celular <sup>199,346</sup>, si bien potencian los efectos de la STH <sup>199</sup>.

La triyodotironina es asimismo capaz de producir síntesis de DNA en animales no hepatectomizados, en combinación con otras sustancias (solución TAGH <sup>165</sup>, solución TK <sup>201</sup>), existiendo una estrecha correlación entre la concentración de dicha hormona en la solución TAGH y la respuesta mitótica y de síntesis de DNA, lo que, según Short <sup>165</sup>, la califica como el factor más influyente de dichos componentes. (pag. 118)

Estudios "in vivo" han podido objetivar, no obstante, que los niveles de tiroxina en sangre, disminuyen después de las 6 a 7 horas siguientes a la práctica de una hepatectomía parcial, permaneciendo aún por debajo de los parámetros normales a las 12 horas <sup>202</sup>. El mismo fenómeno fue detectado por Morley <sup>369</sup>, persistiendo a las 72 horas.

También ha sido relacionado el Factor de Crecimiento Epidérmico (E.G.F.) con el proceso de regeneración hepática. Esta sustancia es un polipéptido de peso molecular aproximado al de la insulina <sup>209</sup>, que tiene la propiedad de estimular el fenómeno mitótico en cultivos de células epiteliales e incluso en fibroblastos.

Este factor es abundante en la glándula submaxilar del ratón, de donde fue aislado, mas su fuente de producción es desconocida.

En el hombre, se ha podido aislar en la orina un polipéptido con idéntica actividad biológica <sup>210</sup>.

Pues bien, Bucher <sup>174</sup> ha observado que el E.G.F. es capaz de producir un perceptible incremento de la síntesis de DNA en ratas no sometidas a resección hepática y que dicho incremento, es aún más acusado mediante la administración de insulina o glucagón.

Del mismo modo, la Somatostatina, polipéptido hallado en el hipotálamo <sup>211</sup> y en los islotes de Langerhans <sup>212</sup>, podría ejercer cierta influencia en la regeneración hepática.

Este supuesto se basa en su capacidad de inhibir significativamente la acumulación de AMP-cíclico en hepatocitos estimulados con glucagón; sin embargo, en ausencia de éste, produce un moderado, pero significativo incremento de dicho AMP-cíclico <sup>213</sup>. Estos datos sugieren, según Oliver <sup>213</sup>, que esta sustancia se comporta en este caso como un agonista parcial.

Asimismo, la somatostatina es un potente inhibidor, tanto "in vitro" como "in vivo" de la insulina y el glucagón, entre otras hormonas <sup>213</sup>.

Se ha comprobado, por otra parte, que la norepinefrina <sup>184</sup>, la ACTH <sup>184</sup>, las prostaglandinas E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> <sup>203</sup> y la hormona paratiroidea <sup>203</sup>, estimulan la actividad de la adenil-ciclase, cuya importancia ha sido ya expuesta anteriormente.

También podrían quizá desempeñar cierto papel en este proceso las diferentes proteínas responsables de la actividad insulínica del suero, "no suprimible" con suero anti-insulina <sup>204</sup>, que, por otra parte, parecen exhibir los mismos efectos que la insulina sobre la actividad de la adenil-ciclase <sup>168</sup>. Del mismo modo, la oxitocina y la vasopresina presentan ciertos efectos similares a la insulina <sup>205,206</sup>.

Por otra parte, se ha podido establecer que la Somatomedina <sup>207</sup>, hormona de naturaleza peptídica (p.m. 8.000) <sup>208</sup>, que actúa como mediadora de las acciones de la STH (de ahí su nombre) en el tejido cartilaginoso, inhibe tanto la actividad basal de la adenil-ciclase en diferentes tipos de membranas celulares (hepatocitos, entre estas), como bajo estímulo con norepinefrina, hormona paratiroidea y prostaglandina E<sub>1</sub> <sup>203</sup>. Al parecer, esta hormona compete con la insulina por los mismos receptores de membrana y ha sido asimismo relacionada con la actividad insulínica "no suprimible" del suero. <sup>204</sup>

Por último existen algunos datos que parecen asignar un notable papel a las hormonas gastrointestinales en el crecimiento celular. Así, la gastrina induce hiperplasia en las células parietales gástricas <sup>214</sup>, aunque la existencia de una posible relación de dicha hormona en este proceso no haya sido establecida. La secretina por su parte, estimula la actividad de la adenil-ciclasa a nivel hepático <sup>148,215</sup> y la pancreocimina aumenta al parecer, los niveles de insulina y glucagón <sup>367</sup>.

Cabría asimismo, incluir en este apartado al "glucagón intestinal", anteriormente analizado.

Todas estas sustancias y quizá otras aún desconocidas, podrían integrar un complejo sistema de efectos sinérgicos y antagónicos, que modularían el crecimiento celular hepático.

SITUACION ACTUAL DE CONOCIMIENTOS EN EL PROCESO DE  
REGENERACION HEPATICA.

En 1920, Rous y Larimore <sup>86</sup>, establecieron la hipótesis de que ciertas sustancias vehiculadas por la sangre portal, podrían prevenir la atrofia hepática y promover la regeneración de este órgano, mas no pudieron aportar datos concluyentes a este respecto, al igual que otros autores <sup>58,59,60</sup>.

Posteriormente, los trabajos de Child <sup>61</sup> y Fisher <sup>62</sup>, <sup>85</sup> entre otros, influyeron notablemente en la casi universal aceptación de la importancia de la cantidad de flujo recibida por el hígado, en menoscabo de las hipotéticas cualidades de la sangre portal (TEORIA VASCULAR).

Sin embargo, en esta última década, debido fundamentalmente a las investigaciones de Price, Starzl y Marchioro con autotrasplantes y homotrasplante auxiliar hepático, así como a los estudios de Price y Bucher con animales sometidos a evisceración de sus órganos abdominales y a los modelos experimentales de trasposición portocava parcial y división esplácnica en perros con diabetes experimental (Starzl y Marchioro), todos ellos anteriormente expuestos; ha quedado fuera de toda duda que la sangre portal posee unas cualidades especiales que afectan profundamente la función y estructura hepatocelular.

Por otra parte, se han podido reunir pruebas concluyentes acerca de la existencia de un mecanismo humoral que controla el proceso de regeneración hepática, basándose en los siguientes datos:

1) Dependencia de la distribución de los fenómenos hiperplásicos según el sentido del flujo intrahepático <sup>22</sup>, <sup>124,125</sup>.

2) Incremento del índice de mitosis y síntesis de DNA en el hígado intacto de animales en parabiosis <sup>110</sup>, <sup>111,112</sup>, o sometidos a circulación cruzada <sup>63,118,121</sup>, después de efectuar una resección hepática en el otro miembro del par.

3) Incremento del índice de mitosis y síntesis de DNA en autotrasplantes hepáticos, subsiguientes a hepatectomía parcial, practicada en el hígado original del animal. <sup>19</sup>, <sup>26,101</sup>

4) Incremento del índice de mitosis en hígados intactos de rata, al inyectar en estos animales, suero o plasma procedente de ratas sometidas a hepatectomía parcial <sup>133</sup>.

5) Incremento notable en el crecimiento de cultivos celulares al añadir a éstos suero de ratas hepatectomizadas. <sup>128,129,130,131,132</sup>

Admitidos estos dos supuestos (importancia de la sangre portal y factor humoral directamente implicado en la manifestación del proceso regenerativo), la discusión se encuentra planteada actualmente en los siguientes términos:

- 1) ¿ Es una sola sustancia la que actúa como "disparador" del proceso regenerativo o es, por el contrario, un sistema multifactorial el que lo gobierna ?.
- 2) ¿ Cual es la sustancia o el conjunto de las mismas que formarían dicho sistema ?.

Respecto al primer punto, existen datos que abogan por un sistema multifactorial, que según Starzl <sup>149</sup>, vendría a explicar la posibilidad de observación independiente de los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia, comprobada por varios autores <sup>27,31,32,33</sup>. Del mismo modo, el gran número de factores involucrados de una u otra forma en este proceso y la disparidad, en múltiples aspectos, de los resultados arrojados por los diferentes modelos experimentales, hablarían a favor de dicha hipótesis.

Abundando en esta cuestión, Sakai <sup>150</sup> ha podido constatar, estudiando el efecto mitogénico del suero obtenido a diferentes niveles, tanto de ratas normales como sometidas a hepatectomía parcial, que el suero procedente de la vena mesentérica presentaba el más potente efecto mitogénico en cultivos de hepatocitos, deduciendo de este hecho la existencia de un factor estimulante vehiculado a través de dicho vaso y seguramente originado en el ileon, ya que la resección de la totalidad del yeyuno no disminuye este efecto, no sucediendo lo mismo cuando el segmento reseñado es el ileon.

Del mismo modo, .apreció que los extractos de bazo e hígado, estos últimos, tanto de rata normal como sometida a hepatectomía parcial, presentaban un efecto inhibidor en los estudios referidos, de lo que deduce la existencia de un factor inhibidor de la regeneración, en ambos órganos, hipótesis discordante por otra parte, con las investigaciones de Levi en hígados perfundidos en circuito cerrado, que apuntan a este órgano como fuente de producción del factor estimulante del proceso regenerativo, cuando ha perdido parte de su masa.

Sakai propugna pues una hipótesis, según la cual, el hígado poseería un factor a modo de "chalona" al igual que el bazo, existiendo un estimulante intestinal, que en condiciones normales mantendrían un equilibrio que se rompería al efectuar una hepatectomía parcial, al disminuir la inhibición ejercida por esta chalona hepática.

Existen, no obstante, algunos aspectos de esta teoría que concuerdan con otras investigaciones:

- La existencia de chalonas o inhibidores de la multiplicación celular está perfectamente demostrada, como se expondrá en otro lugar de esta introducción (pág.126).

- Según Sakai, también existiría una estrecha relación con los estudios de Fisher en animales sometidos a circulación cruzada <sup>63</sup>, en los que se evidenció que una hepatectomía total, producía marcada síntesis de DNA en el hígado intacto del otro animal, interpretando Sakai, que a dicho hígado le llegaría intacto el potente factor estimulante mesentérico.



- Asimismo, también existe correlación con otras experiencias de Fisher <sup>151</sup>, el cual, basándose en los efectos de diversas resecciones parciales de intestino delgado, presupone que el principal origen de los factores hepatotróficos, sería el ileon terminal.

No obstante, en los trabajos efectuados por Starzl, utilizando división esplácnica, la sangre pancreático-espleno-duodenal, se ha mostrado superior a la intestinal <sup>149,169</sup> y en recientes experimentos de Orloff <sup>216</sup>, en animales sometidos a hepatectomía parcial asociada a evisceración selectiva de sus órganos abdominales, la regeneración hepática fue notable en todas las experiencias salvo en los animales en los que se había efectuado una resección pancreático-duodenal, lo que sugiere, según este autor, una localización del principal factor hepatotrófico portal, responsable de la regeneración hepática, en el área pancreático-duodenal.

En cuanto al hipotético inhibidor esplénico, se ha podido observar un efecto adverso del bazo sobre la regeneración hepática, produciendo su extirpación una significativa aceleración de dicho proceso <sup>220</sup>. A este respecto, se sugiere <sup>150</sup> que el bazo pudiera actuar, destruyendo el factor estimulante producido por la hepatectomía parcial. No obstante, el propio Sakai en estudios efectuados con anterioridad, ha sugerido una posible participación de los linfocitos en el proceso de regeneración hepática, basándose

fundamentalmente en la restitución de la capacidad regenerativa de este órgano que exhibían animales irradiados con dosis subletales, al serles administrada una transfusión de linfocitos pertenecientes a ratas hepatectomizadas. <sup>217</sup>

Todos estos datos, sumados a los anteriormente referidos, apuntan hacia un complejo control del fenómeno que nos ocupa, quedando hipotetizada la posibilidad de un factor desencadenante por los estudios de Levi <sup>120</sup>, referidos en varias ocasiones.

En cuanto al segundo punto (origen del factor disparador del proceso o de las sustancias integradas en el sistema multifactorial), la fuente de producción de éstas, podría ser el propio hígado <sup>120</sup>, si bien no se conoce la composición del agente responsable. Dicha hipótesis, también sería avalada por la existencia, si bien más discreta, de fenómenos regenerativos en animales sometidos a evisceración abdominal <sup>137,221</sup>, admitiendo en todo caso la evidencia de una serie de agentes que modularían dicho proceso y entre los cuales habría que destacar fundamentalmente a la insulina y al glucagón.

Autores como Price <sup>135,136,218</sup> y Whittemore <sup>137</sup>, opinan que el glucagón es el principal factor hepatotrófico. En el polo opuesto se encuentran Starzl <sup>149,169,173,219</sup>, Ozawa <sup>195</sup> y Lieberman <sup>175</sup>, entre otros, los cuales asignan a la insulina un papel prioritario sobre cualquier

otro factor. Finalmente, en una postura conciliadora, Bucher y Swafield, que en anteriores investigaciones no habían podido objetivar la importancia de la sangre venosa portal en la regeneración hepática <sup>138</sup>, en una de sus últimas publicaciones <sup>221</sup>, reiteran estas propiedades especiales del efluente portal, y sugieren que es la acción conjunta del binomio hormonal insulina-glucagón la que controla dicho proceso, así como la magnitud de la respuesta regenerativa; tesis compartida por Leffert <sup>176</sup>.

La hipótesis de Bucher, ha sido enunciada en base a los resultados obtenidos en ratas evisceradas a las que se les practicaba además una hepatectomía parcial <sup>221</sup>. Las ratas evisceradas conservaban cierta capacidad de regeneración, objetivada mediante la capacidad en estos animales de síntesis de DNA; el tratamiento con insulina o glucagón independientemente, aumentaba dicho parámetro discretamente; mas, la administración conjunta de ambas hormonas, provocaba un incremento notable de la síntesis de DNA, que llegaba a ser similar al de los animales no eviscerados. Por otra parte, postergando el inicio del tratamiento hormonal a 6 6 7 horas después de la hepatectomía (tiempo en el que los primeros fenómenos regenerativos, ya pueden ser detectados), no existe variación en cuanto a la síntesis de DNA. Este hecho sugiere que, a pesar de la marcada influencia de ambas hormonas, debe existir otro factor o factores que desencadenan la multiplicación celular y que deberían

ser referidos en último término al propio hígado o a otro órgano extraportal, ya que dichos animales eviscerados son capaces de exhibir este fenómeno proliferativo.

También ha sido puesta de manifiesto la acción sinérgica de estas hormonas en situaciones de necrosis hepática aguda, desencadenada por inoculación de virus murino de hepatitis, A-59. Así Farivar <sup>222</sup> ha observado, en ratones sometidos a una dosis letal, que la administración independiente de insulina y glucagón apenas mejoraba su supervivencia, siendo ésta del 40% cuando se administraban conjuntamente ambas hormonas.

Se ha dirigido así la atención de diversos autores hacia las determinaciones de los niveles sanguíneos de estas hormonas y su evolución a lo largo del proceso regenerativo.

Así, Bucher ha podido observar una disminución acusada de los niveles de insulina basales ( $62 \pm 6$  micro U/ml) en sangre portal, que se acercan a 0, a las dos horas de la resección hepática parcial, mostrando una variable recuperación de los parámetros normales <sup>223</sup>. Leffert, por su parte, ha observado dicha variación en sangre sistémica (ventrículo izquierdo) persistiendo aún a las 12 horas de la intervención <sup>202</sup>, y Morley <sup>369</sup> no apreció variaciones apreciables.

Del mismo modo, Sakai ha detectado una disminución de dicha hormona a nivel del tronco portal, que, según los resultados de dicho autor, parece ser debida a disminución

de los niveles en sangre mesentérica, pues los niveles en la vena pancreática disminuyen muy ligeramente; asimismo, existe disminución de dicha hormona en sangre aórtica <sup>150</sup>. Ante estos resultados, razona Sakai que la disminución de los niveles sanguíneos de insulina es debida a un consumo elevado de dicha hormona y que el hecho de que no exista un aumento de su concentración en la vena pancreática es indicativo de que el páncreas no aumenta su producción, lo que, a su entender la descalifica como el posible factor disparador del proceso regenerativo.

El glucagón, por el contrario, aumenta rápidamente en sangre portal <sup>223</sup> después de la resección hasta un 400% a las 4 horas (basal:125 picogr./ml). Leffert <sup>202</sup> ha detectado cifras por encima de 1000 picogr./ml. a las 3 horas, en sangre sistémica (ventrículo izquierdo (basal:180-190 picogr./ml.) manteniéndose aún altos niveles a las 12 horas de la intervención. Asimismo, ha podido apreciar una disminución del 40-60% de la incorporación de glucagón a nivel de membrana celular a las 24 horas, no así a las 6 horas de la resección. Este último dato sugiere, según Leffert, que el propio hígado ejerce en cierta medida un control de su propia restauración <sup>202</sup>. Morley <sup>369</sup>, también ha detectado dicha hiperglucagonemia, si bien más atrasada.

Así pues, parece haber unanimidad en que existe una disminución de insulina y un aumento del glucagón sanguíneo en el proceso de regeneración hepática. Mas la significación de dichas alteraciones pudiera ser inespecífica,

pues se ha podido determinar una hiperglucagonemia subsiguiente a diversos tipos de stress, como traumatismos e infecciones <sup>224,225</sup>, invocándose como mecanismo de este fenómeno la influencia adrenérgica <sup>226,227</sup>, y del Sistema Nervioso Central <sup>227</sup> sobre las células alfa pancreáticas. También es de sobra conocida la hipoinsulinemia postquirúrgica. Sin embargo, Leffert <sup>202</sup> en su modelo experimental anteriormente citado, efectuó un estudio comparativo de diversos tipos de traumas quirúrgicos y su influencia en estos niveles hormonales, observando que la simple laparatomía, la esplenectomía parcial o la adrenonefrectomía, si bien desencadenan una hiperglucagonemia y una hipoinsulinemia, éstas son muchísimo menos acusadas y mantenidas que en los animales sometidos a hepatectomía parcial. Morley <sup>369</sup>, tampoco pudo detectar la hiperglucagonemia tan acusada en animales sometidos a laparotomía.

Por otra parte, se ha podido constatar que una laparotomía previa, seis horas antes de la hepatectomía parcial, acelera la incorporación de timidina, como exponente de síntesis de DNA, con relación a los controles <sup>228</sup>. Asimismo, en cultivos de tejido hepático procedente de animales hepatectomizados, la supervivencia celular es ostensiblemente aumentada cuando se efectúa en dichos animales una resección hepática previa <sup>229</sup>. Estos datos sugieren quizás como común denominador una posible hiperglucagonemia aunque en estos estudios no se efectuaron determinaciones de esta hormona.

A este respecto, Bucher <sup>223</sup> observó que, al implantar una cánula a nivel portal para obtener determinaciones de insulina y glucagón a lo largo del proceso regenerativo hepático en el mismo momento de efectuar la hepatectomía, la síntesis de DNA y la hiperglucagonemia se retrasaban en su aparición y no llegaban a alcanzar los niveles observados en animales en los cuales, la implantación de la cánula portal se efectuaba un día antes de la hepatectomía. Este hecho, pone de manifiesto una estrecha relación de los niveles de glucagón y los de síntesis de DNA. Asimismo, se podría argumentar una correlación del stress que supone la laparatomía previa obligada para la implantación de la cánula con las cifras de glucagón y el índice de síntesis de DNA, que determinaría una notable influencia de esta hormona en el proceso regenerativo hepático.

Después de esta revisión de conjunto acerca del control de dicho proceso, podríamos concluir reiterando la falta de unanimidad y la contraposición en los resultados de los diferentes autores, que traducen en último término la complejidad del fenómeno que nos ocupa.

PROCESO DE REGENERACION HEPATICA



Una vez analizados los hipotéticos factores que gobiernan el proceso de regeneración hepática, pasamos a describir los cambios existentes a lo largo de dicho proceso.

Dividiremos para ello nuestra exposición en los siguientes apartados:

- ALTERACIONES FUNCIONALES.
- CAMBIOS MORFOLOGICOS
  - Período de hipertrofia celular.
  - Período de hiperplasia celular.
- CAMBIOS BIOQUIMICOS.
  - Síntesis proteica.
  - Síntesis de RNA.
  - Síntesis de DNA.
  - Poliaminas en regeneración hepática.
  - Iniciador del proceso de regeneración hepática.

Finalmente, dedicaremos nuestra atención a los dos principales parámetros bioquímicos que han sido estudiados en el trabajo experimental, objeto de la tesis: el Citocromo P<sub>450</sub> y la Fosfatasa Ácida lisosomal.

Según esto, analizaremos los siguientes apartados.

- Citocromo P<sub>450</sub>.
- Retículo endoplásmico hiperactivo e hipoactivo.
- Lisosomas: papel de estos orgánulos en el proceso de regeneración hepática.
- Fosfatasa ácida lisosomal.

### ALTERACIONES FUNCIONALES

La resección hepática efectuada para desencadenar el proceso regenerativo, conlleva ciertas alteraciones en cuanto a las funciones que desempeña normalmente el hígado. De todas ellas, destaca singularmente la disminución de las proteínas plasmáticas.

Ya Chanutin <sup>230</sup>, detectó este hecho en 1938. Posteriormente, otros trabajos han confirmado la disminución de los niveles de proteínas plasmáticas en el proceso de restauración hepática <sup>231,232,233</sup>.

Dicha disminución llega incluso a ser 1'2 g/100 ml. (20% de la habitual) a las 24 horas, dependiendo fundamentalmente de la albúmina y la globulina alfa; a las 48 horas, persiste una clara disminución de los niveles de albúmina <sup>233</sup>.

Estas alteraciones tan acusadas no han podido ser observadas en estudios comparativos con animales sometidos exclusivamente a laparotomía <sup>230</sup>, o privados de alimento por un período de uno o dos días <sup>232</sup>; este último hecho, descarta que pudiera ser debido a la disminución de la ingesta en el postoperatorio. Por último, tampoco se debe esta alteración a hemodilución, como lo confirmaron los valores de hematocrito <sup>232</sup>.

Parece ser pues, que el hígado atiende en primer lugar sus propios requerimientos, desviando la síntesis protéica hacia la producción de proteínas tisulares, necesarias para llevar a cabo su propia restauración <sup>234</sup>.

Otras alteraciones de menor significación incluyen un aumento de la fosfatasa alcalina <sup>235</sup> y una disminución de la capacidad de conjugación de la bilirrubina <sup>236</sup>.

Acompañando a estas alteraciones funcionales descritas, parece existir una marcada pérdida de peso, que puede llegar a suponer un 25% del peso preoperatorio según Becker <sup>238</sup>, que se compensa una vez transcurridos siete días de la intervención. La pérdida de peso registrada en los animales sometidos a laparotomía en el mismo trabajo, no sobrepasó en ningún caso el 15% y se corregía a las 48 horas <sup>238</sup>.

### CAMBIOS MORFOLOGICOS

Como se expuso al principio de esta introducción, la restauración del parenquima desencadenada por la resección hepática se efectúa mediante el crecimiento de los lóbulos restantes, sin reproducirse la estructura anatómica original <sup>1,2</sup>.

Macroscópicamente, el hígado en regeneración es generalmente pálido, no pigmentado y de mayor consistencia respecto al hígado normal <sup>18,138</sup>.

Por otra parte, a nivel microscópico existen una serie de fenómenos que no pueden referirse exclusivamente a una hiperplasia celular, pues los eventos celulares se manifiestan en dos períodos sucesivos:

- Período de hipertrofia celular, en el que se objetiva fundamentalmente, un aumento del tamaño celular.
- Período de hiperplasia celular, en el que destaca principalmente un incremento de actividad mitótica de las células.

#### Período de hipertrofia celular

Este período incluye principalmente los fenómenos bioquímicos de síntesis de RNA y síntesis proteica.

Después de la resección hepática, el tamaño celular incrementa notablemente, pudiendo alcanzar a las 6 horas hasta un volumen 2'6 veces mayor que el de los hepatocitos normales <sup>237</sup>.

Dicho aumento de tamaño afecta tanto al núcleo como al citoplasma, existiendo generalmente una correlación entre ellos, mas no está actualmente claro si dicho aumento del tamaño nuclear precede, acompaña o sigue al incremento de volumen citoplásmico <sup>237,238,239</sup>.

La célula hepática normal presenta por término medio dos o tres nucleolos por núcleo. Dicho número se ve reducido ya a las 6 horas de la resección <sup>240,241</sup>, exhibiendo el 50% de las células un sólo nucleolo prominente a las 16-18 horas, aumentando después de este tiempo el número de éstos nuevamente. Sin embargo, una nueva reducción en el número de nucleolos por núcleo, ha podido ser observada a las 36 horas, debida quizá, según Takatsuka, a un asincronismo en el crecimiento celular <sup>240</sup>.

Esta reducción en el número de nucleolos se acompaña de un incremento de su tamaño <sup>240,242</sup>, hasta de cuatro veces <sup>243</sup>. Estos hechos son interpretados como indicativos de una probable fusión de los nucleolos contenidos en el núcleo, previa a la mitosis, como lo avala el hecho de que no exista un aumento del índice de síntesis de DNA particularmente en el nucleolo <sup>240</sup>.

A nivel del citoplasma, los cambios se traducen en diferentes alteraciones de las diversas organelas del contenido citoplásmico:

- 1.- Pérdida del glucógeno citoplásmico: <sup>169,237,239,244,246,247</sup> aproximadamente el 80% del material PAS positivo celular se pierde durante las prime-

ras 6 horas, desapareciendo casi en su totalidad a las 10 horas para incrementar posteriormente sin que a las 72 horas se hayan alcanzado los niveles normales <sup>239,246</sup>.

Se admite que el glucógeno se utiliza como fuente de energía en los múltiples mecanismos bioquímicos que traducen finalmente la multiplicación celular <sup>237</sup>.

- 2.- Lípidos: Existe un acúmulo de lípidos que incrementa rápidamente después de la hepatectomía, alcanzando un pico máximo entre las 10 y las 24 horas, según los diferentes autores, para mantenerse elevados hasta las 72 horas en que tienden a disminuir <sup>237,239,245,249,250</sup>.

Dicho acúmulo, quizás sea debido a una movilización de grasa periférica, como así lo avala el incremento en plasma de los niveles de ácidos grasos libres y de la captación de ácido oleico marcado, por el hígado <sup>251,252</sup>.

También se especula con una posible utilización de éstos como precursores en la síntesis de lípidos, fundamentalmente fosfolípidos, necesarios para la composición estructural de las nuevas células <sup>237</sup>.

Morfológicamente, dicho incremento se traduce en la existencia de gran cantidad de vacuolas lipídicas.

- 3.- Lisosomas: Estos corpúsculos citoplásmicos, presentan una gran actividad traducida por la temprana aparición de unos cuerpos esferoideos eosinófilos, localizados en el citoplasma, que el M.E. ha podido establecer que se tratan de "autofagosomas", denominativo que expresa la digestión de los diversos componentes celulares (mitocondrias, retículo endoplásmico y gránulos de glucógeno entre otros) y su degradación enzimática <sup>247, 253,256</sup>.

A partir de las 24 horas, reaparecen nuevos lisosomas <sup>253</sup>. Asimismo, es frecuente la existencia de cuerpos lamelares o figuras de mielina <sup>250,253</sup>.

- 4.- Mitocondrias: Existe una disminución de su número y la mayor parte de las existentes presentan alteraciones morfológicas y ultraestructurales a nivel de crestas y matriz mitocondrial <sup>254,255,256</sup>.

Es frecuente observar la degradación enzimática lisosomal de mitocondrias incluídas en los autofagosomas <sup>253</sup>. A partir de las 12 horas, se registra nuevamente una tendencia a la normalidad tanto del número de mitocondrias como en sus características morfológicas.

- 5.- Retículo endoplásmico: Durante las primeras 6 horas, el retículo endoplásmico rugoso se halla

disminuido, apreciándose asimismo al M.E., degradación enzimática de las membranas de dicho sistema en los autofagosomas, encontrándose el resto dilatadas y con marcada pérdida de los ribosomas; a partir de las 12 horas, se registra un incremento de las membranas de dicho sistema que aparecen asociadas a escasos ribosomas, presentando, a partir de las 18 horas, una tendencia a la normalidad 162,244,253,255,256.

Existe asimismo, una tendencia a formar dilatadas vesículas por parte del retículo endoplásmico producido 256.

- 6.- Superficies celulares: Existen, por último, cambios en la superficie celular, perdiéndose las íntimas conexiones intercelulares que se observan habitualmente 247,256.

Así pues, valorando conjuntamente todos estos fenómenos, se puede convenir que existe una simplificación celular con pérdida de la apetencia tintorial citoplásmica, formación de vacuolar, depósito de grasa y pérdida de los orgánulos citoplásmicos a las 6 horas para exhibir posteriormente una reconstrucción paulatina del contenido citoplásmico, en preparación para la etapa mitótica.

Parece pues, que la célula en este período destruye su aparato morfofuncional para adaptarlo a las exigencias de una nueva actividad sintética 253.



#### Período de hiperplasia celular

Este período incluye principalmente los fenómenos de síntesis de DNA y de mitosis.

El hepatocito tiene una vida media aproximada de unos 150 días, por lo que es rara la observación de una figura de mitosis en el hígado normal <sup>127</sup>. El porcentaje de éstas en condiciones basales es de 0'005 - 0'05% de las células.

Por el contrario, en el hígado en regeneración dicho porcentaje incrementa rápidamente a partir de las 24 horas, siendo notable a las 48 horas y discreto a las 72 horas <sup>18, 237, 239</sup>. El mayor índice de mitosis parece estar situado a las 28 horas, en que un 4-5% de las células se encuentra en fase de mitosis <sup>18, 199, 237</sup>.

Otros autores encuentran el mayor índice a las 33 horas <sup>25</sup>, e incluso a las 48 horas <sup>239</sup>.

A este respecto, hay que tener en cuenta que diversas circunstancias como la edad de los animales <sup>23</sup>, el porcentaje de hígado resecado <sup>22, 24</sup> y otras de menor importancia, pueden variar la intensidad de la respuesta proliferativa.

Asimismo, se ha podido observar la existencia de un segundo pico de discreta intensidad situado entre las 52 y las 72 horas, según autores y que Fabrikant <sup>25</sup> relaciona con los restantes componentes celulares hepáticos. A este respecto, Widmann <sup>370</sup>, ha objetivado el mayor índice de mitosis de las células de Kupffer a las 48 horas y el de las células endoteliales a las 96 horas.

A partir de las 72 horas, las figuras de mitosis en el parénquima hepático son escasas, aunque el índice se mantiene ligeramente elevado unos 10-15 días <sup>25</sup>.

El tiempo invertido por cada célula en desarrollar las diferentes fases del período de mitosis es de unas 8 horas aproximadamente, pudiéndose observar figuras mitóticas correspondientes a la profase, metafase, anafase y telofase.

Jaffe <sup>257</sup>, ha podido constatar la existencia de una ritmicidad periódica del fenómeno mitótico en el hígado de rata en regeneración, y Jackson <sup>259</sup> ha apreciado este mismo fenómeno en animales de corta edad, no sometidos a resección hepática.

Esta ritmicidad del fenómeno mitótico parece acompañarse de un ritmo circadiano de la síntesis de DNA en el hígado normal (no apreciada por Fabrikant <sup>25</sup>) y en regeneración, de roedores, como han notificado Halberg <sup>260</sup> y Barnum <sup>261</sup>.

Posteriormente, Barbiroli <sup>258</sup> observó, tanto en hígado normal como en proceso de regeneración, en investigaciones con alimentación y luz controlada: 1°- que el pico de síntesis de DNA acontece a las 23 horas de la resección, si bien puede ser desdoblado, dependiendo de la hora en que se realiza la intervención, en relación a las condiciones de luz y alimentación impuestas; 2°- que el segundo pico se manifiesta en relación a dichas condiciones impuestas, siendo independiente del tiempo transcurrido desde la intervención.

La existencia de este ritmo circadiano explica quizá, junto con la edad de los animales y el porcentaje de hígado resecado, los diferentes resultados que arrojan diversas investigaciones en las que no se han utilizado este tipo de condicionamientos ambientales.

No obstante, la naturaleza del estímulo responsable de esta ritmicidad, tanto en el hígado normal como en el hígado en regeneración, es desconocida. Se hipotetizan <sup>257</sup> varios factores causales, tales como estímulos neurológicos, influencias hormonales y tendencias intrínsecas de cada tejido. A este respecto, Blumenfeld <sup>262</sup> ha podido apreciar en un mismo animal diversos ritmos de mitosis para los diferentes tejidos.

En cuanto al hígado, siguiendo a Barbiroli <sup>258</sup>, habría que admitir que el factor o factores responsables de dicha ritmicidad están íntimamente relacionados con la ingesta alimenticia y los cambios de luminosidad.

Otro punto debatido se refiere a la distribución de la síntesis de DNA y de las mitosis dentro del lobulillo. Así, algunos autores han observado una primaria aparición y localización preferente en las áreas periportales <sup>25,26,118,124,263</sup>, hecho que no ha podido ser comprobado por otros <sup>126,127</sup>. Sigel sugiere que este fenómeno podría referirse a que los hepatocitos de dicha zona son los primariamente expuestos al riego sanguíneo hepático <sup>125</sup>.

Finalmente, se ha podido apreciar un aumento de células poliploides, bien polinucleadas o bien presentando un núcleo único de grandes dimensiones. Dichas células han superado los períodos de hipertrofia, síntesis de DNA e incluso el de duplicación, sin llegar a experimentar ulterior división <sup>25,237</sup>. (Fig. 5) <sup>248</sup>

CAMBIOS BIOQUIMICOS

### SINTESIS PROTEICA

El contenido en nitrógeno hepático aumenta en relación al peso de dicho órgano, como reflejo de la activa síntesis proteica y de ácidos nucleicos que se está llevando a cabo.

Dicho contenido incrementa marcadamente desde las 10 a las 24 horas posteriores al estímulo regenerativo <sup>239</sup>, <sup>264</sup>, manteniéndose un discreto incremento durante varios días. También se ha podido determinar un aumento en el contenido de aminoácidos a las 6 horas y, empleando aminoácidos marcados, se ha podido observar que las proteínas citoplásmicas son más rápidamente marcadas que las nucleares <sup>237</sup>.

Las proteínas formadas en el citoplasma del hepatocito en regeneración, pueden ser divididas en dos tipos:

- 1.- Proteínas específicas hepáticas.
- 2.- Proteínas plasmáticas.

Inmediatamente después de una hepatectomía parcial, los niveles de proteínas plasmáticas y fundamentalmente los de albúmina disminuyen por debajo de las cifras normales, manteniéndose disminuidos durante varios días <sup>230,231</sup>, <sup>232,233</sup>, coexistiendo con una desviación de la síntesis proteica hacia las vías de producción de proteínas ti <sup>234</sup>.



Parece pues, que el hígado en regeneración atiende en un primer tiempo sus propios requerimientos y solamente comienza a elaborar proteínas plasmáticas, una vez transcurridas 48 a 72 horas después de la resección hepática <sup>234</sup>. El incremento de la síntesis proteica parece ser referido fundamentalmente a un aumento en el número de ribosomas que Scornik cifra aproximadamente en un 30% <sup>265</sup>.

Anderson, por otra parte, ha podido apreciar cambios electroforéticos en la subunidad 40S del ribosoma, mientras la subunidad 60S permanece inalterada <sup>266</sup>.

Se podría hipotetizar, según Anderson, que dichos cambios en la subunidad 40S permitirían el reconocimiento de ciertos tipos de mRNA y la síntesis preferencial de determinadas proteínas.

### SINTESIS DE RNA

Para llevar a cabo el incremento en la síntesis proteica anteriormente referido, el cual es necesario para pasar del estado de diferenciación al de multiplicación celular, se precisa un cambio en la dirección del metabolismo celular y, por lo tanto, se hace necesario un incremento de la síntesis de RNA.

Dicho aumento ha podido ser comprobado inmediatamente después del estímulo regenerativo <sup>237,242,267,268</sup>, existiendo un incremento lineal de la incorporación de precursores de RNA, tales como el ácido orótico marcado, en el hepatocito, alcanzando un máximo a las 6 horas, en que su nivel de incorporación es aproximadamente el doble del basal <sup>167,267</sup>.

Respecto a su localización, se ha podido observar que la incorporación nuclear del isótopo precede a la citoplásmica y que, dentro del núcleo, el nucleolo presenta el mayor índice de incorporación <sup>240,242,268</sup>. Posteriormente (a las 6 horas), el incremento es notable tanto en el nucleolo como en el citoplasma <sup>267,269,270</sup>, manteniéndose altos niveles hasta las 20 horas aproximadamente <sup>269</sup>.

Del mismo modo, aumentan su actividad sensiblemente los diversos enzimas en la síntesis de RNA, tales como la RNA-polimerasa nuclear y nucleolar <sup>271,272</sup>. Por otra parte,



la actividad de la ribonucleasas nucleares experimenta un rápido aumento entre las 6 y las 12 horas <sup>273</sup>, no observado en las ribonucleasas citoplásmicas, hecho éste que, según Lorup <sup>273</sup>, podría ser debido a la degradación del antiguo RNA mensajero, ya que durante este período tiene lugar una reorganización de la células y el patrón metabólico es desviado desde el estado de diferenciación celular hacia la vía de multiplicación celular.

Church y Mc Carthy <sup>274</sup>, utilizando técnicas de hibridación, han observado que existe a nivel del núcleo una clase de RNA que no se encuentra habitualmente en el citoplasma, localizándose también en éste último en el proceso regenerativo hepático. Este hecho lo interpretan dichos autores como un exponente de la existencia de un transporte selectivo de ciertas especies de RNA al citoplasma, permaneciendo otros tipos de RNA en el núcleo en condiciones normales hasta que un determinado estímulo aplicado sobre el hígado facilita su transporte al citoplasma; dicha hipótesis es también compartida por Greene <sup>275</sup>.

Asimismo, Church parece haber observado que, después de efectuar una hepatectomía parcial (H.P.), se sintetizan nuevas especies de RNA, hecho interpretado por este autor como indicativo de la existencia de una masiva desrepresión del genoma en las células sometidas al proceso regenerativo; no obstante, estos datos no han podido ser comprobados por otros autores <sup>275</sup>.

Así pues, los mecanismos íntimos responsables del incremento en la síntesis de RNA están en discusión, lo mismo que la forma en que se lleva a cabo la transcripción. Se concede un papel destacado a las histonas como reguladoras de este último fenómeno por el hecho de que su acetilación o fosforilación puede influenciar la interacción DNA-histona, desencadenándose así la inducción de la síntesis de RNA <sup>157</sup>.

Existen pues, muchos mecanismos por aclarar, incluida la estimulación de la síntesis de las poliaminas (pág. 120) en la regeneración hepática y su hipotético papel en el control de los ácidos nucleicos y estabilización de los ribosomas, si bien últimas investigaciones parecen relacionarlas directamente con la síntesis de DNA <sup>276</sup>. Debido a su importante actualidad, las poliaminas merecerán un estudio más detenido en otro lugar de esta introducción.

Resumiendo, existe un aumento de RNA a todos los niveles (mRNA, rRNA y probablemente también tRNA), siendo dicho incremento más acusado para el rRNA, como se desprende del aumento de la demanda proteica en este proceso <sup>245</sup>.

### SINTESIS DE DNA

El hepatocito en interfase posee un aparato imperfecto para llevar a cabo la síntesis de DNA, hecho del que se deriva la baja tasa de duplicación del DNA, que se traduce en un mínimo porcentaje de mitosis en el parénquima hepático.

Por el contrario, en el hígado sometido a estímulo regenerativo, la síntesis de DNA aumenta de forma importante. Este hecho ha podido ser observado, midiendo la incorporación de timidina tritiada al DNA, que refleja fielmente el índice de síntesis de DNA ya que su incorporación se efectúa íntegramente en dicho ácido nucleico puesto que el DNA posee uracilo en su molécula en vez de timina. También se han empleado el  $P_{32}^{18}$  y el ácido orótico marcado  $^{237}$ .

Mediante el uso de estos isótopos, se ha podido establecer que su incorporación al DNA, comienza entre las 12  $^{240,276,277}$ , y las 14 horas  $^{278,279}$ , siguientes a la resección hepática, exhibiendo un pico de máxima actividad entre las 24  $^{22,237,276,277}$  y las 30 horas  $^{240,279}$  posteriores. Transcurrido este tiempo, declinan dichos niveles, si bien algunos autores han podido apreciar un segundo pico de menor cuantía entre las 40 y 50 horas,  $^{237,240}$  situándolo otros autores entre las 65 y 72 horas,  $^{261,279}$  que suponen, podría ser debido a las otras estirpes celulares contenidas en el parénquima hepático.

Anteriormente ya hemos expuesto, al referirnos al período de hiperplasia celular, que parece existir un ritmo circadiano en la síntesis de DNA y se han analizado los factores que pudieran influir en su expresión (pág. 107 ).

Podemos observar, con base en los resultados anteriormente referidos, que el período de máxima actividad de síntesis de DNA, que traduce en último término la duplicación de éste (fase S del ciclo celular), se encuentra situado entre la producción de RNA y síntesis proteica por un lado y la manifestación del fenómeno mitótico por el otro.

Asimismo, todos los enzimas involucrados en la síntesis de DNA (timidin-quinasa y DNA-polimerasa entre otros), aumentan significativamente entre las 12 y las 24 horas 237,245.

Por otra parte, se trata de una síntesis "de novo" ya que puede ser inhibida mediante Actinomicina D. 237,245.

La duplicación tiene lugar cuando en uno de los finales de la doble hélice del DNA se produce una separación de las dos cadenas, las cuales van a combinarse a su vez con los diferentes nucleótidos, según el código genético, mediante la acción de la RNA-polimerasa. No obstante, el mecanismo íntimo que posibilita este fenómeno, se desconoce.

Se ha podido objetivar producción de DNA y mitosis, en animales que no habían sido sometidos a ningún tipo de estímulo regenerativo usual, al administrar varios tipos de sustancias:

- Solución TAGH (triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina). Entre estos constituyentes, parece ser la triyodotironina el más influyente en la producción de estos fenómenos ya que, variando sus concentraciones, existe una correlación directa con la respuesta mitótica y de síntesis de DNA <sup>165</sup>.
- Facilitando una dieta exenta de proteínas por un determinado período, seguida de una comida hiperprotéica o algunos aminoácidos esenciales <sup>280,281</sup>.
- Solución TK (triyodotironina, derivado butirilo del AMP cíclico, teofilina, aminoácidos y heparina) <sup>201</sup>.

Las ventajas de la utilización de este tipo de procedimientos radica en la producción de síntesis de DNA, sin llevar asociados otros posibles fenómenos que pudieran ser debidos a la resección quirúrgica, eliminándose pues factores que puedan ser considerados erróneamente como inherentes al fenómeno de duplicación del DNA, siendo solamente una manifestación reactiva al gesto quirúrgico.

Así, se ha podido determinar que los cambios producidos por estos procedimientos son los siguientes:

- 1) Incremento del número de ribosomas.
- 2) Incremento de los niveles de RNA-polimerasa.
- 3) Incremento del tamaño nucleolar.

A este último fenómeno se le concede especial importancia <sup>165,240,268</sup>. Se ha sugerido que su posible

finalidad podría ser la de acumular continuamente precursores de rRNA <sup>240,268</sup>.

Harris <sup>282,283</sup>, por su parte, hipotetiza una posible relación de este hecho con la expresión de los genes estructurales, actuando quizá como paso obligado en el transporte de moléculas de mRNA al citoplasma.

Así pues, este tipo de investigaciones ha evidenciado que estos tres fenómenos, al menos, son obligatorios para la expresión de síntesis de DNA, sin embargo no aclaran el mecanismo íntimo a través del cual se produce la duplicación del DNA, por lo que serán necesarios nuevos estudios para dilucidar este problema.

En el terreno de las hipótesis, Van Lacker <sup>237</sup> sugiere que la manifestación y la detención de la síntesis de DNA residiría en una propiedad combinada del DNA y alguna sustancia o sustancias proteicas, desconocidas actualmente, que serían sintetizadas, bien anteriormente, bien simultáneamente a la síntesis de DNA.

Asimismo, es necesario valorar el papel de las poliaminas en dicha síntesis pues la administración repetida de 1-3 diaminopropano, inhibidor de la síntesis de estas sustancias, se acompaña de una inhibición de la síntesis de DNA (aproximadamente un 80%), sin afectar de manera importante la síntesis de RNA <sup>276</sup>. Empleando otros inhibidores de la síntesis de poliaminas se han observado resultados similares en cuanto a la inhibición de la síntesis de DNA en otros tipos de células <sup>284,285</sup>.

#### POLIAMINAS EN GENERACION HEPATICA

Las poliaminas son sustancias nitrogenadas no proteicas que han sido halladas tanto en animales como en microorganismos y plantas. Podemos distinguir entre estas la espermidina, la espermina y la putrescina. Las dos primeras derivan sus nombres de la particularidad de haber sido halladas en el semen, en forma de fosfatos.

La síntesis de estos cuerpos se efectúa a partir de dos aminoácidos: ornitina y metionina (Fig. 4).

Existen una serie de datos, algunos de ellos en discusión, que apuntan a dichas sustancias como reguladoras del crecimiento celular y como factores de vital importancia en la regulación genética:

- 1) Se ha podido observar que son esenciales en el crecimiento bacteriano <sup>286</sup>.
- 2) Estabilizan, al parecer, el DNA y el RNA previniendo su degradación enzimática así como el rRNA y ciertas estructuras de membrana <sup>287</sup>.
- 3) Parecen estimular asimismo, la actividad de la RNA polimerasa y la síntesis de RNA, existiendo una proporción directa de los niveles de RNA con los de poliaminas, en hígado de rata en regeneración y en embriones de pollo <sup>288,289,290</sup>.
- 4) La actividad de la ornitina-decarboxilasa y la concentración de poliaminas en el proceso de regeneración hepática <sup>290,291</sup>, así como en diversos tejidos

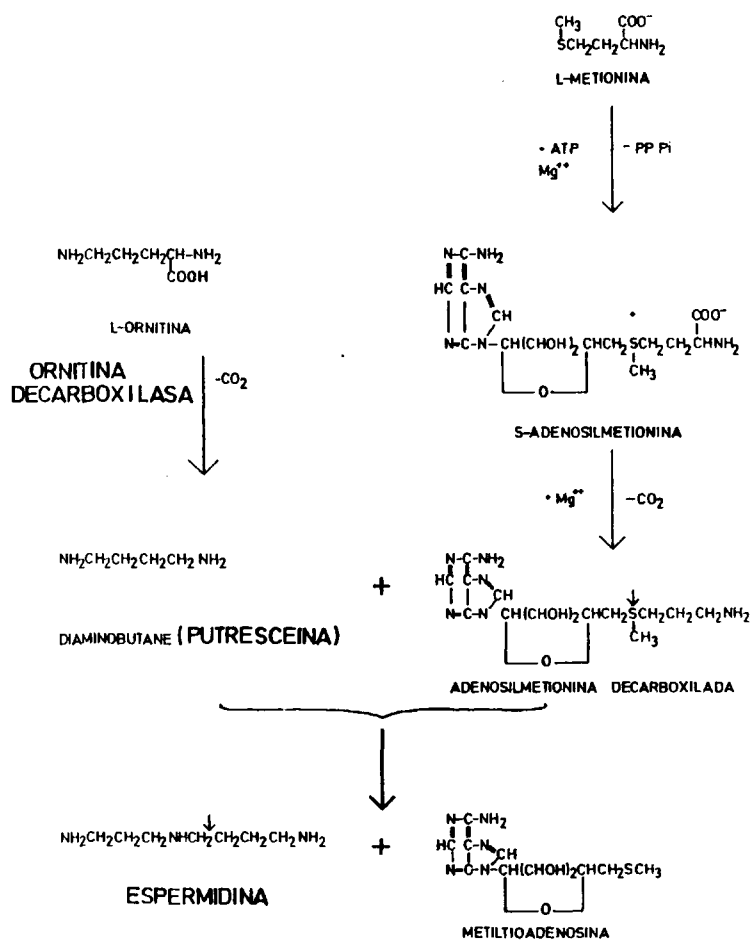


Figura 4



en crecimiento, tales como los embrionarios <sup>292</sup> y cierto tipo de tumores <sup>293,294</sup>, aumenta significativamente.

La actividad de dicha enzima, después de efectuar una hepatectomía parcial, se eleva al tripe en la primera hora, a las 10 horas es 10 veces mayor aproximadamente y a las 16 horas llega a significar una actividad 25 veces mayor que los controles; posteriormente, su actividad declina, siendo aún el triple a las 96 horas <sup>200</sup>. No se ha podido comprobar en cambio, aumento de la decarboxilación enzimática de otros aminoácidos.

Así pues, el aumento de la actividad de dicha enzima aparece paralelamente al incremento de la síntesis de RNA, precediendo ambos a la del DNA.

La hipofisectomía produce una disminución del contenido de espermidina que puede ser restaurado con administración de somatotropina <sup>295</sup>. Por otra parte, la hipofisectomía retarda en unas 20 horas la respuesta mitótica en la regeneración hepática, <sup>18</sup> mientras la somatotropina incrementa dicha respuesta en ratas con hipófisis intacta <sup>198</sup>.

Paralelamente a la disminución de la síntesis de espermidina, la actividad de la ornitina-decarboxilasa en ratas hipofisectomizadas se retrasa, retornando a los niveles basales más rápidamente.

Así pues, este proceder no anula totalmente la actividad de dicha enzima, por lo que la hipófisis puede ejercer una notable influencia, si bien no parece ser responsable en último término de esta actividad enzimática, claramente correlacionable a su vez con el proceso regenerativo.

En ratas tiroidectomizadas, adrenalectomizadas o castradas, no se ha observado disminución de la actividad de dicha enzima, lo que demuestra que los efectos de la hipofisectomía no son mediados a través de sus órganos "blanco" <sup>200</sup>.

Por otra parte, este efecto de la hipofisectomía es en gran parte, compensado mediante administración a estos animales de hormona del crecimiento (somatotropina) y discretamente con Triyodotironina, siendo total la compensación bajo tratamiento combinado de ambas hormonas <sup>200</sup>.

Estos últimos datos sugieren que la hormona del crecimiento es primariamente responsable de la influencia hipofisaria sobre la respuesta regenerativa. Por último, se ha podido constatar, en ratas con hígado intacto, que la hormona del crecimiento produce un marcado incremento de la actividad enzimática de la ornitina-decarboxilasa <sup>200,296</sup>.

En cuanto al papel de las poliaminas en el proceso de regeneración hepática, es evidente que existe una estrecha relación entre los niveles de actividad de la ornitina-decarboxilasa, los de síntesis de poliaminas y los de síntesis de RNA. No obstante, se discute el efecto molecular

de estas sustancias sobre la hipertrofia celular; Raina <sup>297</sup> sugiere que podrían activar genes reprimidos o estabilizar el mRNA y el rRNA.

Las conexiones de estas sustancias con el ciclo de la urea, por otra parte, son muy estrechas ya que la ornitina es un importante intermediario en este ciclo metabólico, con el que también se relaciona estrechamente el carbamil-fosfato, precursor de las pirimidinas. Además, los niveles de amoníaco en sangre no aumentan después de la resección hepática, lo que quizá pueda ser debido a una desviación en el ciclo de la urea hacia la síntesis de poliaminas, lo que, en última instancia, sugiere una interacción entre el ciclo de la urea, las poliaminas y la síntesis de RNA; no obstante, la relación de estas interacciones con la hipertrofia celular no está completamente aclarada <sup>237</sup>.

Por último, recientes investigaciones de Póso <sup>276</sup>, parecen relacionar directamente a las poliaminas con la síntesis de DNA. Este autor, administrando 1'3-diaminopropano (inhibidor de la ornitina-decarboxilasa y de la síntesis de poliaminas) a ratas hepatectomizadas, ha podido observar que disminuye en un 80% aproximadamente la síntesis de DNA, sin apreciar alteraciones en cuanto a la síntesis de RNA.

A la vista de todos estos datos, podemos concluir que, si bien la síntesis de poliaminas se encuentra íntimamente correlacionada con el crecimiento celular y la expresión genética, no existe unanimidad en cuanto al mecanismo por el que se llevan a cabo sus efectos, así como su verdadera significación en el crecimiento celular.

#### INICIADOR DEL PROCESO DE REGENERACION HEPATICA

Aunque, en principio parezca difícil de argumentar que una secuencia tan compleja de fenómenos biológicos puedan ser debidos a la acción de una sola sustancia, la existencia de factores específicos de crecimiento tales como la eritropoyetina, la fitohemaglutinina y el isoproterenol, entre otros, ha justificado la búsqueda de una sustancia que fuera la responsable directa del proceso de regeneración hepática.

Por otra parte, en dicho proceso existe una complejidad aún mayor debido a que afecta a las diversas estirpes celulares que componen el hígado, por lo que quizá los factores inespecíficos como la hormona del crecimiento podrían jugar "a priori" un papel determinante; no obstante, diversos estudios experimentales parecen concluir que ésta no es la responsable directa del fenómeno regenerativo ya que se puede apreciar restauración del parénquima hepático en ausencia de dicha hormona<sup>18,199</sup>, si bien el proceso aparece con cierto retraso.

Hasta el momento, han fracasado todos los intentos efectuados para asignar a una determinada sustancia el papel de "factor iniciador" del proceso regenerativo, aunque existen pruebas concluyentes acerca de la existencia de un factor humoral capaz de desencadenar la hiperplasia celular, como ya se ha expuesto previamente.

Se discute asimismo, si la responsable es una sola sustancia o, por el contrario, es un sistema multifactorial el que permite la expresión de este fenómeno.

En otro lugar de esta introducción se analizan las diversas sustancias implicadas en la expresión y regulación de este proceso, omitiéndolas en este apartado para no caer en la reiteración.

Se plantea asimismo, la posibilidad de que no exista un factor estimulante y desencadenante del proceso sino que éste se manifieste debido a la pérdida de un inhibidor.

Así, en estos últimos años ha cobrado gran importancia en la explicación de este fenómeno la existencia de una serie de sustancias inhibitoras específicas de tejidos que sin embargo, no son especie-específicas y que tienen la capacidad de bloquear las mitosis. Bullough, ha denominado a estas sustancias "chalonas" <sup>298</sup>.

Sucesivamente se han ido describiendo diversas chalonas específicas para la piel (en la epidermis) <sup>299,300</sup>, para los eritrocitos, granulocitos, linfocitos, melanocitos, fibroblastos y otras estirpes celulares <sup>237</sup>.

Saetren <sup>301</sup>, evidenció una chalona específica hepática y Verly <sup>302</sup> ha podido determinar que se trata de un polipéptido de bajo peso molecular (p.m. 1.000).

Simard <sup>303</sup>, por su parte, ha comprobado que una chalona purificada obtenida de hígado de conejo, disminuye notablemente el número de mitosis al ser administrada a

ratas previamente hepatectomizadas. Esto último pone de manifiesto la falta de especificidad respecto a la especie animal. Asimismo, se ha podido establecer, en estudios autorradiográficos con timidina tritiada, que dicha sustancia actúa a nivel de la transición entre las fases de preduplicación ( $G_1$ ) y de duplicación (S) del ciclo celular (Fig. 5). Como es sabido, la transición entre las fases  $G_1$  y S requiere síntesis proteica por lo que se supone que la chalona inhibe esta actividad, impidiendo, por lo tanto la síntesis de DNA (duplicación).

Simard ha podido apreciar además un incremento de la relación metafase/anafase, efectuando estudio morfológico hepático en estas condiciones experimentales, por lo que sugiere también la existencia de un bloqueo a nivel de la transición entre estas dos fases. Por otra parte, esta sustancia no ejerce ningún efecto sobre otros tipos de células (epiteliales de lengua e intestino) lo que parece poner de manifiesto la especificidad tisular de dicho factor.

Se ha podido apreciar que el sobrenadante hepático posee la misma acción bloqueante entre las fases  $G_1$  y S, que se amplía a otras estirpes celulares <sup>303</sup>, lo que sugiriría la existencia de otros inhibidores de la duplicación, haciendo aún más complejo este fenómeno. Sin embargo, esta última observación no ha podido ser refrendada por otras investigaciones <sup>301</sup>.

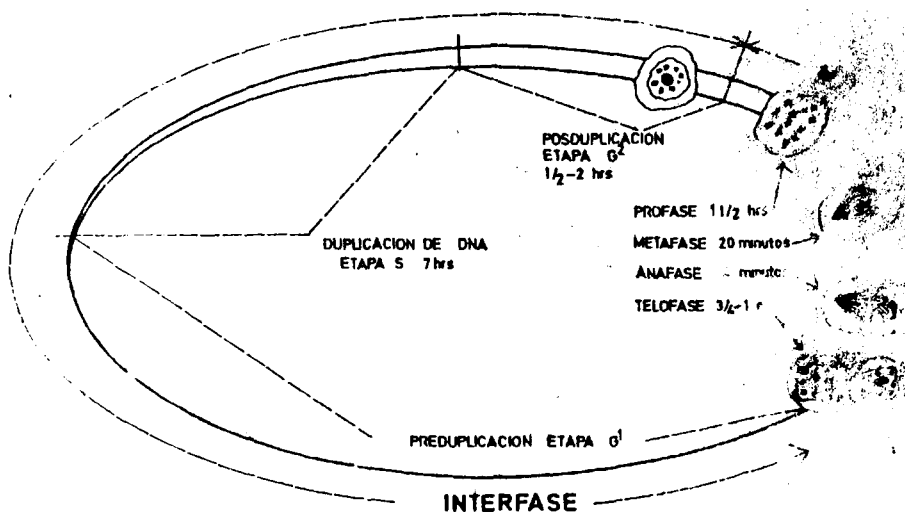


Figura 5

Se plantea pues, el interrogante del mecanismo que haría posible la manifestación de la hiperplasia celular, si, tal como parecen apuntar estas investigaciones, el tejido hepático contiene esta sustancia o sustancias inhibidoras. Van Lancker <sup>237</sup> sugiere que, al extirpar parte del órgano, la cantidad de inhibidor remanente sería inadecuada para mantener la inhibición celular respecto a la síntesis de DNA que existiría en condiciones normales, teniendo entonces este fenómeno ocasión de manifestarse.

Según esta hipótesis, sería lógico pensar que las células tumorales habrían perdido la capacidad de síntesis de estas sustancias; mas, se ha podido determinar su presencia en células tumorales, las cuales parecen haber perdido en parte la sensibilidad a los efectos inhibidores de estos agentes <sup>302</sup>.

Son pues necesarios nuevos estudios en este campo que quizá podrían aportar nuevos enfoques terapéuticos en diversas hepatopatías, así como en tumores hepáticos.

Por otra parte, se ha especulado con la supuesta importancia de la pérdida del fenómeno de "inhibición de contacto" en el desencadenamiento de la hiperplasia celular.

Así, Miyamoto <sup>167</sup> ha observado que el mucopolisacárido de revestimiento celular responsable de la adherencia celular (fenómeno de inhibición de contacto) <sup>304,305,306</sup>, desaparece temporalmente precediendo a la aparición de mitosis. Asimismo, la pérdida de dicho mucopolisacárido ha



sido relacionada con la activación de proteasas endógenas y, más concretamente, con las catepsinas B y D <sup>167</sup>.

Mediante el empleo de inhibidores de estas proteasas (leupeptina y pepstatina), se ha podido apreciar disminución de la síntesis de RNA y DNA y del índice de mitosis en el hígado en regeneración, pudiéndose correlacionar este hecho, mediante procedimientos histoquímicos, con la presencia del mucopolisacárido de revestimiento, el cual desapareció en los controles unas 20 horas después de la hepatectomía <sup>167</sup>.

Este hecho parece sustentar que dicho mucopolisacárido juega un papel importante en la manifestación hiperplásica hepática, sugiriendo al mismo tiempo una relación de las proteasas lisosomales con la iniciación de la proliferación celular hepática. Abundando en este tema, otra proteasa, la papaína (pepsina vegetal), inyectada en cavidad peritoneal, desencadena síntesis de DNA y producción de mitosis coexistiendo con una desaparición del mucopolisacárido ácido de revestimiento <sup>307</sup>, hecho éste que, sumado a los anteriormente expuestos, confiere un papel destacado a las proteasas en la multiplicación celular.

Si pequeño es el conocimiento actual sobre la puesta en marcha de este proceso, menor aún lo es el mecanismo que detiene el fenómeno proliferativo una vez restaurada la masa hepática original.

Se ha propuesto un mecanismo de control de tipo "feed-back" <sup>237</sup> según el cual, cada sustancia sintetizada inhibiría el sistema responsable de la activación de los enzimas involucrados en su síntesis.

Son pues necesarios nuevos estudios en este campo para dilucidar las múltiples incógnitas que persisten en la actualidad.

### CITOCROMO P<sub>450</sub>

La presencia de un pigmento susceptible de ligar CO en la fracción microsomal hepática de ciertos mamíferos, ha sido referida por Klingenberg <sup>308</sup> y Garfinkel <sup>309</sup>. Posteriormente, se ha podido establecer su naturaleza hemoprotéica <sup>310</sup> así como que se trata del enzima terminal de la cadena transportadora de electrones del sistema de biotransformación microsomal.

Dicha enzima ha recibido el nombre de Citocromo P<sub>450</sub> debido a que su máximo de absorción característico está situado a 450 nm en atmósfera de CO <sup>310</sup>.

El sistema de biotransformación microsomal, que morfológicamente está referido al retículo endoplásmico liso (R.E.L.), metaboliza una amplia variedad de sustratos endógenos tales como los ácidos grasos, hormonas esteroideas y ácidos biliares así como sustratos exógenos como ciertas drogas, carcinógenos, insecticidas, etc.

En efecto, se ha podido determinar la transformación y metabolismo de más de 250 compuestos mediante este sistema <sup>311</sup>, teniendo estos sustratos como única similitud la de poseer una región hidrófoba en su composición <sup>312</sup>.

El sistema de biotransformación microsomal es un complejo sistema de transferencia de electrones, cuya función más importante es la hidroxilación y en el que destacan dos componentes: el Citocromo P<sub>450</sub> y una flavoproteína (NADPH citocromo P<sub>450</sub> reductasa).

El Citocromo P<sub>450</sub> está fuertemente ligado a los fosfolípidos de las membranas del R.E.L., pudiendo ser convertido en una forma soluble (P<sub>420</sub>) que es inactiva, por tratamiento de los microsomas en ambiente anaerobio con deoxicolato, siendo así separado de dichas membranas <sup>313</sup>.

El P<sub>450</sub> es el citocromo más importante de la célula hepática <sup>314</sup>. Su p.m. es de unos 50.000 aproximadamente <sup>371</sup>. El hígado de rata normal posee unos 0'7-0'9 nmoles/mg, de proteína microsomal <sup>317,337</sup>. La concentración en el hombre es más baja que en dicho animal, lo que explica quizá la mayor lentitud en el metabolismo de las drogas en el ser humano. Alrededor de un 4% de todas las proteínas del R.E. corresponden al Citocromo P<sub>450</sub>, pudiendo aumentar esta cifra hasta un 20% en ratas inducidas. Por otra parte, el sistema de transferencia de electrones de los microsomas puede llegar a consumir un 20% de O<sub>2</sub> utilizado en el hígado y un 6% del correspondiente a la totalidad de la economía <sup>314,317</sup>. Todos estos datos avalan pues la importancia metabólica de dicha sustancia.

El P<sub>450</sub> se localiza a nivel del R.E.; ni la membrana nuclear <sup>318,319</sup>, ni la membrana plasmática ni la del Golgi <sup>320</sup> contienen cantidad apreciable de dicho citocromo. No obstante, no es específico del hígado de mamíferos, pues también se ha podido determinar en otras especies y en bacterias <sup>321,322,323</sup>, así como en otros tejidos tales como el riñón, pulmón, intestino, testículos, suprarrenales, bazo, páncreas, músculos y cerebro <sup>321</sup>.

Los sustratos metabolizados por este sistema se dividen en dos tipos:

- Sustratos del tipo I: se incluyen aquí una amplia variedad de drogas, estableciéndose la combinación a nivel del componente protéico del P<sub>450</sub> (fenobarbital, aminopirina...).

- Sustratos del tipo II: éstos establecen relación directa con el grupo HEMO del citocromo ( anilina y otras aminos) <sup>324</sup>.

Por último, existen diferencias en cuanto al sexo; así, las ratas machos poseen una cantidad 20% mayor que las ratas hembras y metabolizan los sustratos del tipo I con mayor rapidez que el sexo opuesto; en cambio, los sustratos del tipo II se metabolizan de una manera similar en ambos sexos <sup>325,326,327,337</sup>.

#### RETICULO ENDOPLASMICO HIPERACTIVO E HIPOACTIVO.

La administración de ciertas drogas produce una inducción del sistema de biotransformación microsomal que se traduce en una hipertrofia celular, que conlleva un incremento del peso hepático; ambos hechos, referidos a un notable aumento del R.E.L., así como a las actividades de la NADPH Citocromo P<sub>450</sub> reductasa y del Citocromo P<sub>450</sub>, más la evolución ulterior de estos dos últimos parámetros, en caso de prolongarse la administración de la droga, puede ser totalmente opuesta, dependiendo del agente empleado en la inducción.

Así el fenobarbital, si se administra más de 4 ó 5 días, no altera estos fenómenos, manteniéndose los niveles alcanzados y persistiendo por tanto la hiperactividad del R.E. 329.

Por el contrario, la administración prolongada de dieldrin<sup>330,331</sup> (insecticida clorado), entre otras sustancias, produce los siguientes efectos, traducidos en tres períodos diferentes: en el primero, se observa hipertrofia del R.E.L. con incremento de las proteínas microsomales y de los niveles de P<sub>450</sub>; en el segundo período se mantienen estos fenómenos de una forma estable, apreciándose en el tercer período (fase de descompensación), que si bien persiste el aumento del peso hepático así como del P<sub>450</sub> y de las proteínas microsomales, la actividad hidroxilante del sistema de biotransformación disminuye. Este fenómeno ha sido denominado R.E. hipertrófico hipoactivo.

Estas observaciones suscitan la posibilidad de manifestación de una respuesta de adaptación y de franca toxicidad bajo un mismo patrón morfológico, sugiriendo al mismo tiempo un defecto en la eficacia del sistema de biotransformación microsomal ante ciertos agentes.

Por otra parte, también se puede llegar a producir un R.E. hipoactivo de forma primaria, mediante la administración de tetracloruro de carbono <sup>332,333</sup>, observándose al cabo de unas dos horas una evidente disminución de la concentración del P<sub>450</sub> y de la actividad del sistema de biotransformación. También, mediante la administración combinada de fenobarbital y aminotriazol <sup>334</sup>, se desencadena una síntesis incompleta de dicho citocromo, apreciándose una hipertrofia del R.E., encontrándose éste desprovisto de Citocromo P<sub>450</sub> (membrana vacía). En estos últimos casos, el R.E. hipoactivo se asocia con disminución de los niveles de P<sub>450</sub>.

Hutterer <sup>330</sup> ha podido observar que el fenómeno de inducción del R.E. se asocia con alteraciones de otras organelas celulares, concretamente con las mitocondrias. A este respecto, existen estrechas relaciones entre ambos componentes citoplásmicos; así, se ha demostrado que el ácido deltaaminolevulínico regula la biosíntesis del HEMO, componente a su vez del Citocromo P<sub>450</sub> <sup>335</sup>. Quizá pueda este hecho explicar el aumento del número y tamaño de las mitocondrias en la primera fase de la administración de dieldrin <sup>330</sup>.

Además, en la fase de R.E. hipertrófico hipoactivo desencadenada por esta droga, existe una disminución de la función oxidativa mitocondrial así como anomalías en la forma de estas organelas, con reducción de sus crestas y disminución de su número.

Estos hechos, según Hutterer<sup>330</sup>, pueden ser debidos a que la disminución de la capacidad hidroxilante de este sistema, permite una afectación mitocondrial debida a la droga almacenada en el hepatocito.

Tanto si el R.E. es hiperactivo como si es hipoactivo, puede ejercer un efecto beneficioso o perjudicial sobre los hepatocitos, dependiendo de que el efecto tóxico celular sea debido a la propia droga o a los metabolitos de ésta, producidos después de haberse puesto en contacto con el sistema de biotransformación microsomal. Los efectos tóxicos de muchas drogas, como el dieldrin, disminuyen por la existencia de membranas hiperactivas, mas los efectos del tetracloruro de carbono y del bromobenceno se potencian<sup>324</sup>.

En animales portadores de tumores, la actividad biotransformadora también es escasa. Así, en los hígados de ratas afectas de hepatoma de Morris<sup>336</sup> y carcinoma de Walker<sup>337</sup> se ha objetivado una disminución, tanto del P<sub>450</sub> como de la capacidad de hidroxilación esteroidea. En el propio hepatoma, el contenido de P<sub>450</sub> se encuentra por debajo de las cifras normales e incluso se halla ausente<sup>336.338</sup>.



En otro orden de cosas, Rubin <sup>339</sup> ha observado que la derivación portocava terminolateral reduce marcadamente la actividad hidroxilante del R.E.L., si bien exhibe éste una clara hipertrofia, al igual que en los animales controles.

De todos los datos anteriormente mencionados, se desprende la importancia de dicha sustancia en el metabolismo hepático y los dos últimos puntos plantean la problemática de su comportamiento a lo largo del proceso regenerativo hepático.

LISOSOMAS: PAPEL DE ESTOS ORGANULOS EN EL PROCESO DE  
REGENERACION HEPATICA.

Los lisosomas son vesículas membranosas repletas de enzimas hidrolíticas. Desde su descripción original por Christian de Duve <sup>340</sup> en 1955, el conocimiento de estos orgánulos citoplásmicos ha experimentado un notable progreso.

Implicados directamente en la digestión de cierto tipo de sustancias que, por su composición, la célula no puede utilizar directamente, fenómeno que determina la formación de un fagosoma, se ha podido comprobar que estos atributos se extienden a la lisis de la propia célula y de sus organelas citoplásmicas. Este fenómeno recibe el nombre de "autofagia celular" y ha sido observado en gran variedad de tejidos en estados de anoxia y otros tipos de daño celular <sup>244,341,342</sup>. Por otra parte, la formación de "autofagosomas" en tejidos fetales o en animales recién nacidos ha sugerido que estos orgánulos podrían estar directamente implicados en un proceso selectivo de recambio de estructuras celulares que, referidas principalmente a determinadas funciones metabólicas, no son requeridas, en principio, para llevar a cabo el fenómeno de división celular <sup>343,344</sup>.

En ratas sometidas a hepatectomía parcial, se ha objetivado la presencia de unos cuerpos esferoideos, eosinófilos, localizados en el citoplasma, que aparecían una

media hora después de la resección hepática, exhibiendo la mayor cuantía entre las 6 y las 9 horas, siendo su número exiguo a partir de las 24 horas. El tamaño de estos cuerpos se correlacionaba directamente con el tiempo transcurrido, llegando a alcanzar hasta unas 20  $\mu$  de diámetro. Dichos cuerpos contienen fosfatasa ácida, como se ha podido comprobar utilizando la técnica de Gomori, siendo aquellos de mayor diámetro los que exhiben menor actividad de este enzima.

Con la ayuda del M.E., se ha podido comprobar que estos cuerpos traducen la existencia de lisosomas autofagocíticos (autofagosomas) que contienen:

- 1) Mitocondrias en diversos estadios de degradación.
- 2) Gránulos de R.E. y membranas de este sistema.
- 3) Gránulos de glucógeno<sup>253,344</sup>.

Los autofagosomas de mayor tamaño exhiben disminución de su apetencia por los colorantes así como menor densidad al M.E., además de la menor actividad de la fosfatasa ácida, anteriormente referida, por lo que se interpretan como estadios terminales de dichos cuerpos <sup>253</sup>.

Coexistiendo con la presencia de autofagosomas, se pueden observar los llamados "cuerpos lamelares" o "figuras de mielina", que corresponden a material lipídico no digerido por estos cuerpos y que presentan el mismo aspecto que las vainas de mielina de los nervios, de ahí su nombre <sup>253</sup>.

La significación de estos cambios tan notables, tanto en el número como en la actividad de los lisosomas, está en discusión.

La observación de que ciertas porciones del citoplasma, dañadas por diversas causas, pueden ser eliminadas por autólisis localizada <sup>342</sup>, sumado a la posibilidad de suprimir el fenómeno autofagocitario en animales sometidos previamente a inanición, sin afectación concomitante de las mitosis al efectuar una hepatectomía parcial, hablarían a favor de que el fenómeno autofagocitario sería un mecanismo inespecífico a disposición de la célula.

Otros autores <sup>345,346</sup>, sugieren que este fenómeno podría traducir la respuesta celular al estímulo mitótico, hipótesis reforzada por la observación de que la prednisona es capaz de suprimir el estímulo hiperplásico de la fitohemaglutinina sobre los linfocitos, mediante la estabilización de las membranas lisosomales <sup>346</sup>.

En cualquier caso, es indudable que los lisosomas desempeñan un importante papel en este proceso y que su función consistiría en destruir la mayor parte de las organelas citoplásmicas como preparación de la célula hacia una nueva actividad sintética, cuyo fin último es la división celular.

En otros estudios expuestos anteriormente, se ha podido correlacionar directamente la actividad de ciertas

proteasas lisosomales con la pérdida del mucopolisacárido ácido de revestimiento celular (responsable del fenómeno de inhibición por contacto) y con la síntesis de ácidos nucleicos y la producción de mitosis, hecho que sugiere una relación directa de las proteasas lisosomales con la iniciación de la proliferación celular. <sup>167</sup>

En otro orden de cosas, Ashford y Porter <sup>347</sup>, han objetivado la existencia de fenómenos de autofagia celular en hígado de rata perfundido y aislado, mediante la administración de glucagón, hecho observado asimismo en hígado de ratas a las que les era administrado glucagón a nivel intraperitoneal <sup>348,349,350,351</sup>.

La administración de esta hormona produce un aumento de la actividad de la fosfatasa ácida libre obtenida del extracto citoplásmico y de las fracciones mitocondrial + lisosomal, sin observarse cambio alguno en el contenido total de fosfatasa ácida respecto a los controles. Estos datos sugieren que existiría quizá un aumento de la fragilidad lisosómica, hipótesis comprobada por la mayor sensibilidad al shock osmótico en dichas fracciones <sup>351</sup>.

Parece ser que este efecto autofágico del glucagón es mediado a través del AMP-cíclico. Así lo sugieren diversas investigaciones: Exton <sup>352</sup>, utilizando hígado de rata perfundido y aislado ha podido determinar que dicha hormona incrementa los niveles intracelulares de AMP-cíclico en pocos minutos. Por otra parte, Shelburne <sup>166</sup>

ha observado que la administración intraperitoneal de dicho AMP-cíclico es capaz de producir un fenómeno de autofagia en el hígado de rata normal, similar al producido por el glucagón, lo cual sugiere que dicho proceso es mediado, al menos en parte, por el AMP-cíclico.

En otro orden de cosas, se plantea el mecanismo de movilización del glucógeno hepático, desencadenado por diversas hormonas (glucagón, adrenalina) y la posible participación de los lisosomas en este fenómeno metabólico.

En la enfermedad de Pompe (glucogenosis tipo II), la ausencia de la alfa-glucosidasa lisosomal, enzima capaz de producir degradación de glucógeno, ocasiona un acúmulo de grandes cantidades de polisacáridos en el interior de los lisosomas<sup>353,354</sup>, observación que sugiere un posible papel de estos orgánulos en la movilización del glucógeno celular.

Kotoulas<sup>162</sup>, ha efectuado estudios histoquímicos y ultraestructurales en hígado de ratas recién nacidas bajo estímulo con glucagón. El período postnatal es un excelente modelo para el estudio de la movilización del glucógeno, pues en las 12 horas siguientes al nacimiento existe una masiva movilización del glucógeno hepático almacenado<sup>355,356</sup>. Pues bien, dicho autor ha podido comprobar que existe una disminución del glucógeno tisular hepático al administrar dicha hormona, acompañándose de un incremento en el número de autofagosomas, los cuales se locali-

zan preferentemente en los márgenes de las áreas con mayor acúmulo citoplásmico de glucógeno.

Según estas observaciones, se podría convenir que el glucagón, además de regular la descomposición del glucógeno hialoplásmico (fosforilación), también influencia la metabolización del glucógeno lisosomal (hidrólisis) en estas células <sup>162</sup>.

Rosenfeld, sugiere que la vía hidrolítica lisosomal podría adquirir relevancia en casos de demanda urgente de glucosa, como pueda ser el caso que nos ocupa <sup>357</sup>.

Por lo demás, se ha podido constatar que no existe aumento de la actividad total de la fosfatasa ácida <sup>162</sup>, <sup>348</sup>, lo que parece indicar que no existe síntesis "de novo" de hidrolasas lisosomales en la inducción de autofagia celular; tampoco se observaron variaciones en el R.E. ni en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa <sup>162</sup>.

Resumiendo, se ha observado reiteradamente la existencia de desglucogenización importante después de efectuar una hepatectomía parcial así como la existencia de autofagosomas, que se localizan preferentemente en los márgenes de áreas ricas en glucógeno. Todo ello parece sugerir una intervención lisosomal en su descomposición, la cual, por otra parte, parece ser favorecida por la administración de glucagón <sup>162,358</sup>.

#### FOSFATASA ACIDA LISOSOMAL

Los lisosomas contienen una serie de enzimas tales como la hialuronidasa, beta-N-acetilglucosaminidasa, catepsinas B y D, beta-glucuronidasa y desoxirribonucleasa, entre otros, pero quizá sea la fosfatasa ácida la más característica de estos cuerpos.

Una vez observado el comportamiento de los lisosomas en los fenómenos de multiplicación celular, parece obligado el estudio de sus actividades enzimáticas.

A este respecto, se ha podido determinar que el fenómeno de autofagia celular es prácticamente nulo a partir de las 24 horas posteriores a la resección hepática, como ya se ha expuesto anteriormente, acompañándose de una marcada disminución de la actividad lisosomal <sup>359,360</sup>.

Por otra parte, se ha observado que las células tumorales presentan asimismo dicha disminución de la actividad enzimática lisosomal, datos constatados tanto en cultivos de células tumorales durante la mitosis <sup>361</sup>, como en tumores inducidos en animales de experimentación, tanto a nivel hepático como en otras localizaciones <sup>362,363,364</sup>, lo que parece indicar que existe un comportamiento similar con respecto a este punto entre las células tumorales y las células en proceso regenerativo.

Fischer-Szafarz <sup>360</sup> ha efectuado un estudio dinámico de la actividad de varias enzimas lisosomales (fosfatasa



ácida entre éstas) a nivel de la fracción mitocondrial en el proceso de regeneración hepática, observando un importante incremento de la actividad de la hialuronidasa y catepsina D y un discreto aumento del 10% en la actividad de la fosfatasa ácida, seguido de una prácticamente total desaparición de esta actividad en todas las enzimas al final de la fase G<sub>1</sub> (antes del inicio de la fase de duplicación) (Fig. 5); posteriormente va incrementando lentamente la actividad de estas enzimas, encontrándose aún distantes de los niveles habituales al cabo de unos 11 días.

A la vista de estos datos, según Fiszer-Szafarz<sup>360</sup>, se podrían distinguir dos procesos diferentes:

- 1) Función de los lisosomas antes de la mitosis.
- 2) Reorganización del sistema lisosomal en las nuevas células:

En el primer período, incrementa la actividad de las enzimas lisosomales, traducción de los fenómenos de autofagia celular, siendo estas enzimas utilizadas, al parecer, sin una renovación concomitante.

El segundo período representaría una lenta restitución del sistema lisosomal en las nuevas células, producto del fenómeno mitótico<sup>360</sup>.

Por el contrario, existe una mayor proporción de hidrolasas en la fracción microsomal<sup>237</sup>, hecho que parece

avalar la hipótesis de que dichas enzimas se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso siendo transferidas seguidamente al aparato de Golgi, donde se formarían los lisosomas <sup>365</sup>, según un proceso similar al de los gránulos de cimógeno. En este sentido, destaca la situación preferencial de los autofagosomas en las cercanías del aparato de Golgi <sup>162</sup>, además de las áreas ricas en glucógeno. Según estas observaciones, el Golgi podría proveer nuevos lisosomas utilizables en el proceso regenerativo hepático.

Por último, Adams <sup>368</sup> ha podido constatar en el proceso de regeneración hepática un aumento de la actividad de la fosfatasa ácida libre y total, datos que son opuestos a los arrojados por otros estudios citados anteriormente, en los que los fenómenos de autofagia celular se desencadenaron con otro tipo de estímulos <sup>162,348</sup>.

**H I P O T E S I S**  
=====

#### HIPOTESIS DE TRABAJO

Desde que Rous y Larimore apuntaron la posibilidad de que ciertas sustancias vehiculadas por la sangre portal podrían prevenir la atrofia hepática y promover la regeneración de dicho órgano, se ha debatido enconadamente esta cuestión, valorándose alternativamente dos posibilidades.

- 1) La importancia de la sangre portal para el hígado vendría referida simplemente al flujo sanguíneo que representa (TEORIA VASCULAR).
- 2) La sangre portal sería el vehículo de una serie de sustancias "hepatotróficas" que desempeñarían un papel determinante en la conservación y regeneración de dicho órgano.

En esta última década, los modelos experimentales ya citados de Starzl, Bucher, Price y Whittemore, entre otros autores, han inclinado la balanza hacia la tesis de que la sangre portal posee unas cualidades hepatotróficas especiales que han sido atribuidas principalmente a las hormonas pancreáticas insulina y glucagón.

Partiendo de estos supuestos, se han efectuado determinaciones de estos dos agentes en el proceso de regeneración hepática <sup>150,202,223,369</sup>, tanto a nivel de sangre portal como sistémica, observándose importantes variaciones

en los niveles de ambas hormonas en relación a animales controles o sometidos a otros tipos de trauma quirúrgico 202,369, hecho que confiere a dichas sustancias un evidente papel en dicho proceso.

Sin embargo, en animales sometidos a evisceración de sus órganos abdominales, se ha podido comprobar la existencia del fenómeno regenerativo hepático, si bien más discreto y retrasado en su manifestación, lo que en principio, parece invalidar la hipótesis de que las hormonas referidas actúen como iniciadores del proceso regenerativo, si bien, la corrección de dichas alteraciones después de la administración conjunta de ambas, las califican como factores de primer orden en la modulación y expresión de dicho proceso.

Dentro de las determinaciones bioquímicas a valorar en el proceso de regeneración hepática, se han escogido el Citocromo P<sub>450</sub> y la Fosfatasa ácida lisosomal, en las fracciones microsomal y mitocondrial respectivamente.

#### CITOCROMO P<sub>450</sub>

La gran importancia metabólica de esta sustancia nos ha inclinado a realizar el estudio de dicho citocromo en el proceso de regeneración hepática.

Se ha podido determinar que la actividad del sistema de biotransformación microsomal es escasa en animales portadores de diversos tipos de tumores, acompañándose de una

disminución de los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> y de la capacidad de hidroxilación esteroidea en células tumorales <sup>336,337,338</sup>.

En otro orden de cosas, Rubin <sup>339</sup> ha demostrado que la derivación portocava reduce igualmente la capacidad de hidroxilación de las drogas por el sistema de biotransformación microsomal, coexistiendo con una clara hipertrofia del retículo endoplásmico liso (R.E. hipertrófico hipoactivo).

Finalmente, recientes trabajos de Hino <sup>383</sup> han puesto de manifiesto una disminución de los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> a lo largo del proceso regenerativo.

#### FOSFATASA ACIDA LISOSOMAL

Las proteasas lisosomales han sido asimismo directamente relacionadas con el proceso de regeneración hepática y los lisosomas experimentan cambios importantes inmediatamente después de haber sido aplicado el estímulo regenerativo, transformándose en "autofagosomas", los cuales intervienen activamente en la lisis de las organelas celulares. El glucagón, por otra parte, ha sido directamente relacionado con los fenómenos de autofagia celular <sup>347, 348,349,350,351</sup>.

Se ha escogido para realizar el estudio de las enzimas lisosomales, la fosfatasa ácida, la cual es una de las más características de estos orgánulos citoplásmicos.

Fischer-Szafarz <sup>360</sup> ha podido apreciar que la actividad de dicha enzima a nivel de la fracción mitocondrial, disminuye marcadamente después de un incremento previo del 10%, llegando a una desaparición prácticamente total al final de la fase G<sub>1</sub> (antes del período de duplicación del DNA).

Por otra parte, las células tumorales parecen exhibir asimismo, una disminución de la actividad enzimática lisosomal <sup>361,362,363,364</sup>.

Existen pues analogías evidentes entre las células hiperplásicas propias del proceso de regeneración hepática y las células tumorales, tesis reforzada por la existencia de alfa-fetoproteína en los hepatocitos en fase de regeneración, detectada por inmunofluorescencia y por acusado incremento de ésta en el suero de animales sometidos a estímulo regenerativo. <sup>372</sup>.

Asimismo, el hígado en regeneración es capaz de responder al estímulo hipóxico con síntesis de eritropoyetina de la misma forma que los hepatocitos en el período embrionario <sup>373</sup>.

Todos estos hechos fueron analizados, planteándose el trabajo experimental objeto de la tesis, con las siguientes cuestiones iniciales:

- 1.- Podrían detectarse variaciones en la producción pancreática de insulina y glucagón y en el consumo hepático de dichas hormonas a lo largo del proceso regenerativo.

- 2.- En base a las múltiples analogías entre las células tumorales y las células hiperplásicas en regeneración, se podría esperar quizá una disminución de los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> en la fracción microsomal a lo largo del proceso, al igual que en los estudios de Hino.
- 3.- Se podría hipotetizar asimismo, una disminución de la actividad de la fosfatasa ácida lisosomal a nivel de la fracción mitocondrial (fracción que incluye a dichos orgánulos), según los trabajos de Fiszer-Szafarz y las analogías entre las células en regeneración y las tumorales.
- 4.- Considerando que en el polo de sección producto de hepatectomía parcial, podrían presentarse alteraciones tanto bioquímicas como morfológicas en relación a un proceso de cicatrización normal, hemos considerado necesario correlacionar los parámetros bioquímicos y morfológicos en dicho polo de sección con los del parenquima distal al mismo. Dicha correlación podría ser, asimismo, de gran utilidad en cuanto a la diferenciación de las alteraciones producidas por el estímulo regenerativo y otros fenómenos sobreañadidos.
- 5.- La correlación dinámica morfológica a lo largo del proceso resultaría indispensable, en cuanto a la valoración del fenómeno regenerativo, en nuestro trabajo experimental.



**PLANTEAMIENTO**  
=====

Con el fin de resolver las cuestiones enumeradas anteriormente, se planteó el trabajo experimental objeto de la tesis, teniendo como fundamento el estudio del Proceso de Regeneración hepática en la rata Wistar, provocado mediante resección del lóbulo izquierdo hepático (hepatectomía del 30%) 118,374.

Se emplearon animales del mismo sexo (machos) para evitar posibles diferencias en cuanto a los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> 337.

En dicho planteamiento, se ha procurado en todo momento ofrecer una visión dinámica de este fenómeno, adecuando los diversos estudios según las fases fundamentales del proceso así como en aquellos momentos en los que era previsible detectar variaciones singulares importantes de los factores en estudio.

De acuerdo con dichos factores escogidos para el estudio de este proceso, podríamos distinguir los siguientes apartados:

#### DETERMINACIONES HORMONALES

1) Insulina y glucagón.

#### DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

2) Citocromo P<sub>450</sub>.

3) Fosfatasa ácida lisosomal.

#### CORRELACION MORFOLOGICA SERIADA

1) Insulina y glucagón.- Las alteraciones de los parámetros normales de dichas hormonas han sido observadas rápidamente después de la resección hepática.

Con el fin de detectar las posibles variaciones en la producción pancreática de ambas hormonas, se decidió efectuar una extracción a nivel del tronco portal; asimismo, para objetivar el consumo hepático de ambos agentes hormonales se hacía necesaria una segunda extracción a nivel de las venas suprahepáticas.

En los animales controles se efectuaron las extracciones mencionadas (suprahepática y portal).

En los animales sometidos a hepatectomía parcial (H.P.) se establecieron diferentes grupos, según el tiempo transcurrido desde la intervención hasta que se efectuaron las extracciones.

De acuerdo con este planteamiento, podríamos distinguir los siguientes grupos:

A)	Grupo	Muestra
	I	Basal (no sometido a H.P.)
		S. Portal
		S. Suprahepática
	II	1 hora después de H.P.
		S. Portal
		S. Suprahepática
	III	6 horas después de H.P.
		S. Portal
		S. Suprahepática
	IV	24 horas después de H.P.
		S. Portal
		S. Suprahepática
	V	48 horas después de H.P.
		S. Portal
		S. Suprahepática
	VI	72 horas después de H.P.
		S. Portal
		S. Suprahepática
	VII	7 días después de H.P.
		S. Portal
		S. Suprahepática

2) Citocromo P<sub>450</sub>. - Los niveles de esta sustancia, pieza fundamental del sistema de biotransformación microsomal, traducirían los cambios de dicho sistema a lo largo del proceso.

Con arreglo a la hipótesis de trabajo, en cada grupo de animales se determinaron los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> en la fracción microsomal, tanto a nivel del polo de sección como a nivel del parénquima distal del mismo.

Con objeto de establecer una estrecha correlación con la evolución de los microsomas, se efectuaron valoraciones de las proteínas microsomales y de lípidos y fosfolípidos en dicha fracción.

De acuerdo con este planteamiento, podríamos distinguir los siguientes grupos:

B) Grupo	Muestra
1	Basal (no sometido a H.P.)
2	6 horas después de la H.P. polo distal polo de sección
3	24 horas después de la H.P. "
4	48 horas después de la H.P. "
5	72 horas después de la H.P. "
6	7 días después de la H.P. "
7	14 días después de la H.P. "

3) Fosfatasa ácida lisosomal. - La actividad de esta enzima fue determinada a nivel de la fracción mitocondrial, siguiendo la misma pauta que se ha expuesto para el Citocromo P<sub>450</sub>.

Se efectuó asimismo, la valoración de las proteínas en la fracción mitocondrial a lo largo del proceso.

Correlación morfológica seriada.- Su valoración, tanto óptica como ultramicroscópica, es indispensable para determinar las diversas alteraciones morfológicas que exhibe el hígado en regeneración y fundamentalmente los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia.

Según las exigencias de nuestra hipótesis de trabajo, el estudio morfológico se correlacionó con el planteamiento bioquímico, concluyendo dicho estudio a los 7 días de la intervención.

Como se puede apreciar, los tiempos elegidos para el estudio dinámico de los diversos factores coinciden con las fases fundamentales del proceso de regeneración:

- 6 horas: máxima síntesis de RNA.
- 24 horas: pico de síntesis de DNA y comienzo del fenómeno mitótico.
- 48 y 72 horas: fenómeno mitótico evidente.
- 7 días: tiempo llegado al cual, se acepta que la mayor parte del proceso ha concluido.

A las determinaciones efectuadas en dichos períodos se les añadió en cada caso las que eran aconsejables para lograr una valoración dinámica más completa del factor en estudio.

**M A T E R I A L   Y   M E T O D O S**  
=====

#### MATERIAL Y METODOS

El desarrollo del planteamiento experimental se ha llevado a cabo en 140 ratas Wistar cuyos pesos oscilaban entre 300 y 420 gramos.

Todos los animales empleados en nuestro estudio fueron machos, con el fin de evitar errores en la interpretación de los resultados, teniendo en cuenta las diferencias, según el sexo, en el sistema de biotransformación microsomal y más concretamente en los niveles de Citocromo P<sub>450</sub><sup>325,326,327,337</sup>.

Dichos animales permanecieron en cajas adecuadas, a temperatura ambiente constante y teniendo libre acceso a alimentación especial de laboratorio y agua.

Las intervenciones se efectuaron entre las 10 y las 13 horas, con objeto de evitar la posible influencia de las variaciones diurnas en el proceso regenerativo<sup>257, 258,259,260,261</sup>.

El anestésico empleado fue el éter, según el procedimiento habitual.

A través de una laparotomía media se efectuó una hepatectomía parcial (H.P.), consistente en la resección del lóbulo izquierdo hepático, dejando una mínima parte de éste, de acuerdo con nuestro planteamiento experimental.

#### METODOLOGIA GENERAL

Con el fin de obtener las muestras hepáticas para el estudio bioquímico y morfológico en óptimas condiciones, el total de los animales empleados (140) se dividió en dos grupos de 70 animales.

##### GRUPO A

Los animales incluidos en este lote fueron utilizados para la determinación de los niveles de insulina y glucagón, tanto a nivel portal como suprahepático (Fotos A y B).

##### GRUPO B

En los animales que conformaban este segundo lote, se efectuaron las determinaciones bioquímicas (Citocromo P<sub>450</sub> y Fosfatasa ácida lisosomal, entre otras) y el estudio morfológico óptico y ultramicroscópico.

Debido a los condicionamientos particulares de dichas determinaciones, la valoración dinámica de los diversos factores en estudio se efectuó de la siguiente forma: el total de los animales de cada grupo se subdividió en diferentes lotes de 10 animales, según el tiempo transcurrido desde la resección hepática, una vez llegado al cual, eran sacrificados, previa extracción de las diferentes muestras.

De acuerdo con la metodología expuesta y nuestro planteamiento experimental, los diversos grupos y subgrupos se diferenciaron de la siguiente forma:





Foto A.- Punto de extracción de la sangre portal.(f)



Foto B.- Punto de extracción de la sangre supra-hepática.(f)

<u>GRUPO A</u>	<u>Nº ANIMALES</u>	<u>MUESTRA</u>
I	10	Basal (no sometido a hepatectomía parcial) (H.P.)
II	10	1 hora después de la H.P.
III	10	6 horas después de la H.P.
IV	10	24 horas después de la H.P.
V	10	48 horas después de la H.P.
VI	10	72 horas después de la H.P.
VII	10	7 días después de la H.P.

<u>GRUPO B</u>	<u>Nº ANIMALES</u>	<u>MUESTRA</u>
1	10	Basal (no sometidos a hepatectomía parcial) (H.P.)
2	10	6 horas después de la H.P.
3	10	24 horas después de la H.P.
4	10	48 horas después de la H.P.
5	10	72 horas después de la H.P.
6	10	7 días después de la H.P.
7	10	14 días después de la H.P.

En este segundo grupo, cada determinación bioquímica se estableció sobre el homogeneizado de 5 ratas y la correlación morfológica se efectuó en los seis primeros lotes de animales, según el planteamiento expuesto.

### DETERMINACIONES HORMONALES

#### Recogida de muestras

La sangre extraída (2'5 ml.) se introdujo en un tubo de ensayo que contenía 0'05 ml. de EDTA al 10% (sal dipotásica y magnésica del ácido etilendiaminotetracético) y 1.250 U de aprotinina (Trasylol, Bayer). Posteriormente, se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.

A continuación, se separa el plasma y se conserva a -20°C.

#### ANALISIS RADIOINMUNOLOGICO DEL GLUCAGON

Las determinaciones del glucagón en el plasma de la rata, se realizaron empleando el antisuero 30K. Este antisuero es considerablemente específico para el glucagón pancreático; es decir, posee escasa afinidad hacia el GLI intestinal <sup>375</sup>.

#### Preparación del glucagón radioactivo (glucagón-I<sup>125</sup>)

La molécula de glucagón posee dos residuos de tirosina, en los que se puede incorporar fácilmente yodo radioactivo. En nuestro sistema, seguimos la técnica descrita por Greenwood <sup>376</sup>, para marcar hormona del crecimiento, empleando I<sup>125</sup> (período de semidesintegración 60 días) en lugar de I<sup>131</sup> (período de semidesintegración 8 días).

#### Material empleado

- Glucagón: 5 µg (beef-pork glucagón, Eli Lilly) disueltos en 5 µl de HCL 0'02 N.
- I<sup>125</sup>: 3 mCi (la concentración del yodo radioactivo debe oscilar entre 100 y 300 mCi/ml).
- Cloramina-T: 35'2 mg. disueltos en 10 ml. de buffer de fosfato 0'05 M (pH 7'5).
- Metabisulfito sódico: 24 mg. disueltos en 10 ml. de buffer de fosfato 0'05 M (pH 7'5).
- Yoduro potásico: 100 mg. disueltos en 10 ml. de buffer de fosfato 0'05 M (pH 7'5).
- Buffer de fosfato 0'5 M (pH 7'5): 6'5 g. de HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0'69 g. de H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O disueltos en agua hasta un volumen total de 100 ml.
- Buffer de fosfato 0'05 M (pH 7'5): se prepara a partir del anterior.
- Glicina 0'2 M con 0'5% de albúmina humana (pH 8'8): se prepara a partir de glicina 0'4 M a la que se añade albúmina humana, NaOH y agua.

#### Procedimiento

En un tubo de ensayo (10x0'75 cm.) se pipetea:

- 1- 50 µl de buffer de fosfato 0'05 M.
- 2- 5 µl de la solución de glucagón (5 µg).
- 3- 3 mCi de yodo radioactivo en un volumen de 10 a 30 µl.
- 4- 10 µl de la solución de cloramina-T (35 µg).

- 5- Inmediatamente después se agita, y a los 25 segundos se añaden 50  $\mu$ l de la solución de metabisulfito sódico (120  $\mu$ g).
- 6- 200  $\mu$ l de la solución de yoduro potásico (2 mg).
- 7- Este preparado se lleva a un volumen final de 2 ml. añadiendo glicina 0'2 M con 0'5% de albúmina humana.

La hormona marcada queda a una concentración de 2'5  $\mu$ g/ml

#### Purificación del glucagón- I<sup>125</sup>

Una vez obtenido, el glucagón radioactivo se separa del I<sup>125</sup> libre y de los posibles productos de degradación de la hormona. Este proceso se realiza a través de una columna de celulosa, según la técnica descrita por Yalow y Berson <sup>377</sup>.

#### Material empleado

- Columna de polietileno (1x10 cm.)
- Celulosa (Whatman).
- Buffer de veronal 0'1 M (pH 8'6): 20'6 g. de barbital sódico y 3'68 g. de barbital ácido disueltos en agua hasta un volumen total de 1 L.
- Buffer de veronal 0'05 M (pH 8'6): se prepara a partir del anterior.
- Suero de carnero.
- Albúmina humana al 15%.
- Trasylol.

#### Procedimiento

- En una columna de celulosa de 2'5 cm. de longitud, previamente equilibrada con veronal 0'1 M, se deposita una mezcla del producto marcado y de suero de carnero (proporción 1:1).
- Seguidamente, se eluye la columna con venoral 0'1 M, empleando alrededor de 30 ml. En este volúmen aparece el  $I^{125}$  libre y los fragmentos de glucagón- $I^{125}$ .

#### Material empleado

- Cámara de electroforesis conectada a una fuente de energía de alto voltaje (Buchler Mod. n°3-1014 A).
- Bandas de papel Toyo (30x2'7 cm.).
- Buffer de veronal 0'05 M ( $\mu=0'05$ ), pH 8'6.
- Solución de azul de bromofenol al 0'5% en glicina 0'2 M.
- Suero de carnero.

#### Procedimiento

- Una vez equilibradas las bandas (alrededor de 30 minutos) se aplica una parte alicuota del eluido en un volumen de 0'2 m. de glicina 0'2 M (pH 8'8), al que se han añadido 0'05 ml. de suero de carnero y 1  $\mu$ l de la solución de azul de bromofenol, y se somete a una diferencia de potencial de 720 voltios durante 45 minutos.
- Finalizada la cromatoelectroforesis, se procede al secado de las bandas y a su división en tres partes:
  - 1- Zona de aplicación de la muestra, donde permanece el glucagón -  $I^{125}$ .
  - 2- Zona de emigración de los productos de degradación del glucagón -  $I^{125}$ , que acompañan a las proteínas del suero y al colorante.

### 3- Zona de emigración del $I^{125}$ libre.

En cada una de estas partes se determina la cantidad de radioactividad por medio de un contador de emisión gamma, y se calcula el porcentaje que contienen con relación a la aplicada inicialmente.

- La concentración del glucagón- $I^{125}$  purificado se determina estableciendo una relación entre la radioactividad presente en el glucagón- $I^{125}$  sin purificar - cuya concentración es conocida (2'5 ug/ml.) - y la detectada en los eluidos, previa corrección de las cuentas por minuto (cpm) correspondientes al  $I^{125}$  no incorporado (valorado por cromatoelectroforesis).

Si X es la concentración que se desea conocer:

$$\frac{1 \text{ ml. glucagón-}I^{125} \text{ sin purificar (cpm)}}{2'5} = \frac{1 \text{ ml. eluido (cpm)}}{X}$$

- La actividad específica del glucagón- $I^{125}$  obtenida oscila entre 300 y 400 uCi/ug.

#### Sistema radioinmunológico empleado

El esquema general desarrollado es el siguiente:

- Glucagón- $I^{125}$ : 15 pg. (0'5 ml).
- Trasylol: 2.000 U (0'1 ml).
- Muestra (plasma o solución standard): 0'2-0'4 ml.
- Antisuero 30K (a la dilución correspondiente para obtener una final de 1:81.000): 0'2-0'4 ml.

El volumen final se adapta a 1'2 ml.

La curva standard se prepara con una mezcla de glucagón cristalino de buey y de cerdo (Eli Lilly).

Como medio de dilución se utiliza glicina 0'2 M con 0'25% de albúmina humana y 1% de suero de carnero (pH 8'8).

- Una vez añadidos todos los elementos del sistema en tubos de 7x0'9 cm. se incuban durante cuatro días a 4°C. con el fin de que la reacción alcance su equilibrio. Tras este período, se procede a la separación del glucagón-I<sup>125</sup> libre del glucagón-I<sup>125</sup> unido al anticuerpo.

#### Separación por carbón saturado con dextrano

Esta técnica, descrita por Herbert <sup>378</sup>, se basa en la facultad que tiene el carbón saturado con dextrano de adsorber selectivamente la hormona radioactiva libre.

#### Reactivos

- Carbón Norit A
- Dextrano T 20 (Pharmacia).
- Glicina 0'2 M, pH 8'8
- Suero de carnero.

#### Procedimiento

- La presencia de una cierta cantidad de proteínas favorece el proceso de separación. Las muestras de plasma sin diluir no precisan ninguna adición, ya que su contenido proteico es suficiente. En el caso de las soluciones de la curva standard, se ajusta



una concentración de proteínas similar a la del plasma, añadiendo la cantidad adecuada de suero de carnero.

- El complejo carbón-dextrano se prepara mediante una mezcla a partes iguales de:

Suspensión de dextrano al 0'5% en glicina 0'2 M.

Suspensión de carbón al 1% en glicina 0'2 M.

Esta mezcla se mantiene en agitación constante por medio de un sistema magnético.

- A cada muestra se añade 0'5 ml. de la suspensión carbón-dextrano y se incuba a 4°C durante 45 minutos. Inmediatamente después, los tubos se centrifugan a 2.500 r.p.m. y a 4°C. tras lo cual la fracción líquida es separada por aspiración, quedando en el tubo el sedimento de carbón que ha adsorbido la hormona radioactiva libre. Habitualmente, sólo se mide la radioactividad presente en esta fracción, ya que por diferencia con la total (inicial) de la muestra, se obtiene la correspondiente al complejo glucagón-I<sup>125</sup>- anticuerpo que es expresada en forma de porcentaje de la radioactividad total.

- En cada muestra se efectúa la corrección del porcentaje de unión del glucagón-I<sup>125</sup> al anticuerpo considerando el correspondiente a la unión inespecífica de muestras análogas que no contienen antisuero:

$$\%B_c = \frac{\%B_{ac} - \%B_o}{100 - \%B_o} \times 100$$

$\%B_c$  = porcentaje corregido de unión del glucagón- $I^{125}$  al anticuerpo.

$\%B_{ac}$  = porcentaje de unión detectado en las muestras que contienen antisuero.

$\%B_o$  = porcentaje de unión inespecífica detectado en las muestras sin antisuero.

#### ANALISIS RADIOINMUNOLOGICO DE INSULINA

La insulina- $I^{125}$  se prepara siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para el análisis del glucagón; en este caso, se emplean 2 mCi de  $I^{125}$ . La actividad específica de la hormona radioactiva oscila entre 200 y 300  $\mu$ Ci/ $\mu$ g.

El sistema empleado para la valoración de insulina, es el siguiente:

- Insulina- $I^{125}$ : 50 pg. (0'75 ml.)
- Muestra (plasma o solución standard de insulina cristalizada de rata, Novo): 0'05 ml.
- Antisuero GP-26 (a la dilución correspondiente para obtener una final de 1:200.000): 0'2 ml.

Las muestras se incuban a 4°C. durante dos días y el proceso de separación de la insulina- $I^{125}$  libre de la

unida al anticuerpo, es análogo al descrito para el análisis de glucagón; en este caso, la suspensión carbón-dextrano, tiene una concentración final de 3% de carbón, y 0'25% de dextrano.

### DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

- 1- Determinación de citocromo P<sub>450</sub>
- 2- Determinación de fosfatasa ácida.
- 3- Valoración de proteínas.
- 4- Extracción de lípidos.
- 5- Valoración de fosfolípidos.

#### Homogeneización del tejido

Una vez extraído el tejido hepático, se lavó para eliminar la sangre, con tampón fosfato 0'1 M, pH=7, conteniendo 1'15% de CIK; después se troceó el tejido y se secó sobre papel de filtro antes de pesarlo, volviéndose a lavar posteriormente con la misma solución tantas veces como fueron necesarias, hasta eliminar la sangre.

Los fragmentos de tejido libres de sangre, se homogeneizaron en un Sorvall-Omni-mixer, empleando la solución antes mencionada en la proporción 1:8 (peso/volumen). Las operaciones se realizaron a 0° C.

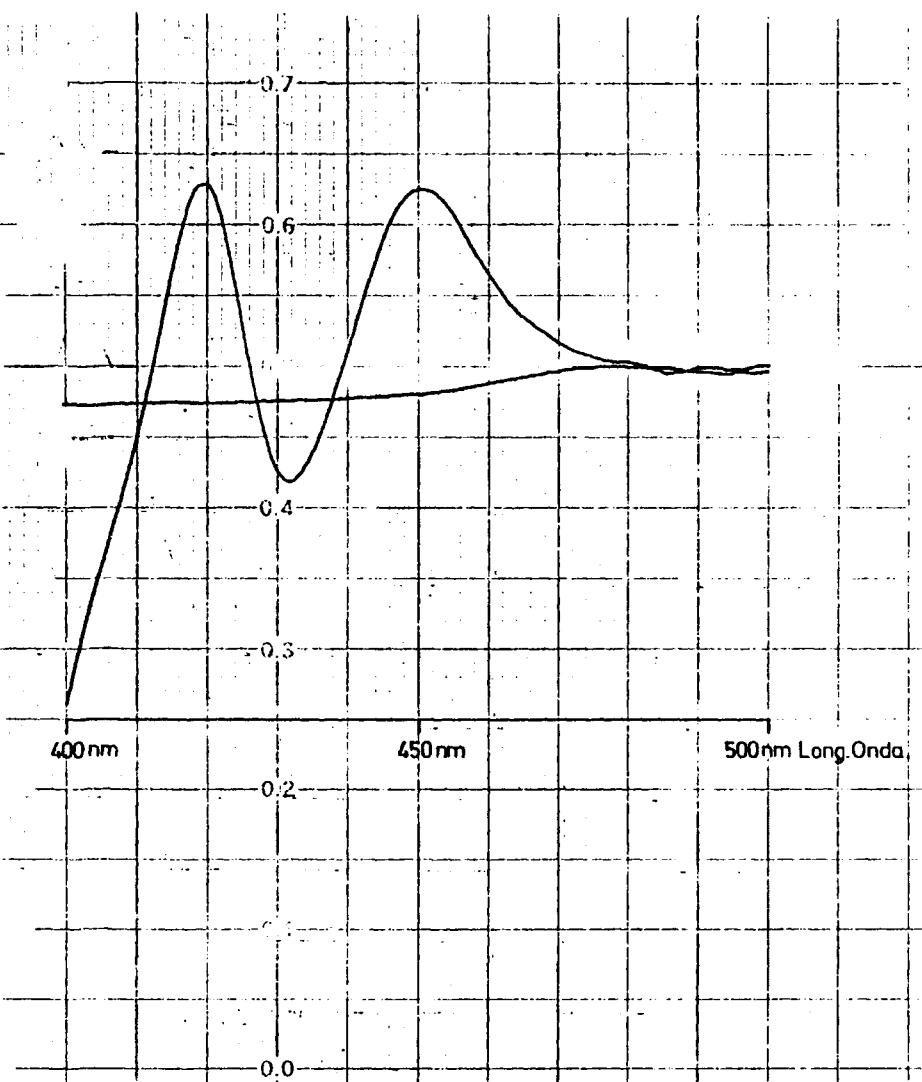
#### Obtención de fracciones mitocondrial y microsomal

El homogeneizado, después de filtrar por gasa, se sometió a centrifugación en una centrífuga Sorvall con rotor SS-34, en primer lugar a 10 minutos a 3000 r.p.m. para eliminar núcleos y fragmentos de tejido.

El sobrenadante, se sometió a centrifugación durante 10 minutos, a 12.000 rpm.; el sedimento se resuspendió en tampón y volvió a repetirse la operación; el sedimento obtenido se consideró fracción mitocondrial. El sobrenadante se sometió a centrifugación en una ultracentrífuga Beckman-L-4, rotor tipo 40 a 100.000 g., durante 90 minutos, obteniéndose un sedimento final, constituido por la fracción microsomal.

#### 1.- Determinación de citocromo P<sub>450</sub>

El citocromo P<sub>450</sub>, se ha valorado según el procedimiento descrito por Omura y Sato<sup>310</sup>. La fracción microsomal se ha resuspendido en tampón fosfato 0'1 M, pH=7, empleando un homogeneizador Potter. Después de conocer la concentración en proteínas de la suspensión microsomal, ésta se diluye con agua destilada hasta que el contenido en proteínas sea de 1 mg/ml.; con esta suspensión se ha realizado un espectro diferencial adicionando a ambas cubetas varios mg. de ditionito sódico por gr. de proteína microsomal; se establece la línea base y para obtener el espectro, se burbujea CO en la cubeta de muestra y se hace un barrido entre 500 y 400 nm. de longitudes de onda en un espectrofotómetro modelo Cary 118 y siendo las condiciones de operación más frecuentes, un rango de absorbancia de 0'5, una velocidad de carta de 20 nm/inch y una velocidad de longitudes de onda de 0'5 nm./sec.



Citocromo P<sub>450</sub> - Espectro de Absorción.

La concentración de citocromo se ha determinado aplicando un coeficiente de extinción molar  $E=91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .

2.- Determinación de actividad de fosfatasa ácida en fracción mitocondrial.

La fracción mitocondrial se resuspendió en tampón citrato 0'1 M y pH=4'9 empleando un homogeneizador Potter.

Una alícuota de 0'3 ml. se incubó en 6 ml. de solución de fenilfosfato sódico 1'08 g/l a 37° C. durante 15 minutos, parándose la reacción con 2'7 ml. de reactivo de Folin. El fenol liberado, se determinó por colorimetría.

3.- Determinación de proteínas.

En todas las experiencias realizadas se ha efectuado la valoración del contenido total en proteínas del preparado enzimático con el fin de poder calcular actividades enzimáticas específicas y hacer comparables los resultados obtenidos de ellas.

Dicha valoración de proteínas se realiza por el método de Lowry <sup>379</sup>, utilizando los siguientes reactivos:

Reactivo A:  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% en NaOH, 0,1N.

Reactivo B:  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0'5% en tartrato sódico al 1%.

Reactivo C: 50 vol. de reactivo A + 1 vol. de reactivo B.

Reactivo de Folin=Ciocalteu diluido: 1 vol. de reactivo.

Fólin-Ciocalteu (Merck) + 2 vol. de agua destilada.

El procedimiento seguido fue:

A 1 ml. de la solución problema de proteínas se le adicionaron 5 ml. de reactivo C, preparado inmediatamente antes de ser usado, agitando la mezcla y dejándola a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se le adicionaron 0'5 ml. de reactivo de Folin diluido agitándose de nuevo y dejándose actuar durante 40 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado este tiempo, se medirá a 500 u la absorbancia del color azul-verdoso aparecido, realizándose la lectura frente a un blanco constituido por una mezcla preparada según se ha descrito anteriormente, en la que se sustituye la solución problema por 1 ml. de agua destilada.

La concentración de proteínas en el problema se deduce a partir de una curva patrón construída con los datos de absorbancia obtenidos con diferentes soluciones de albúmina de suero bovino cristalizada (Sigma) de concentración= 1 mg/ml. Esta curva patrón se construye para cada valoración de proteínas.

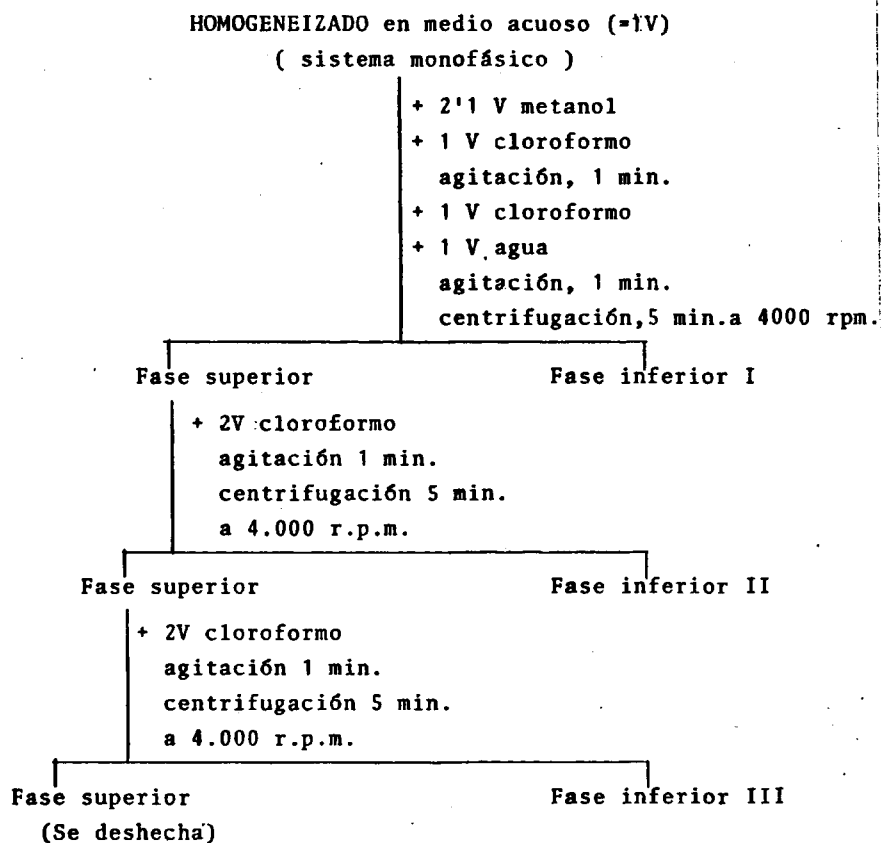
Este método es sensible para determinar cantidades comprendidas entre 150 y 800 ug de proteína/ml. por lo que es necesario efectuar las disoluciones adecuadas de la muestra del preparado enzimático de manera que su concentración de proteína se encuentre dentro de los límites citados.



#### 4.- Extracción de lípidos totales

Se realizó según el método de Bligh y Dyer <sup>380</sup>, considerando como unidad de volumen (1 V) el volumen del homogeneizado.

El proceso de extracción se efectuó siguiendo el esquema adjunto, centrifugándose después de cada paso de extracción con objeto de facilitar la separación de ambas fases.



... Finalmente, con objeto de eliminar cualquier contaminante no lipídico, los extractos clorofórmicos reunidos, se lavaron dos veces con un volumen equivalente a 1/5 del volumen final del extracto de una solución constituida por: cloroformo-metanol-NaCl al 0'58% (3:48:47), o bien con un volumen equivalente al de los extractos reunidos de solución de Folch-Pi (NaCl 0'05 N).

Los extractos clorofórmicos son llevados a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida (15-20 mmHg), manteniendo la temperatura a 37°C. La eliminación de agua residual retenida en dichos extractos, se realizó mediante disoluciones repetidas del extracto ya concentrado, en metanol anhidro, llevando de nuevo a sequedad en evaporador rotatorio, hasta conseguir un peso constante.

Finalmente, los extractos lipídicos secos se conservarán en congelador a -30° C. y bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, hasta su próxima utilización.

#### 5.- Determinación de fósforo

El análisis cuantitativo de fosfolípidos, se realizó determinando su contenido en fósforo mediante colorimetría, según el método modificado de Rouser <sup>381</sup>.

El fósforo de los fosfolípidos se mineralizó mediante la adición de 0'9 ml. de ácido perclórico al 70%, seguida de calentamiento a 250° C. durante 25 minutos en un baño de arena. Una vez transcurrido el tiempo, son retirados los

matraces y enfriados en baño de agua a temperatura ambiente. Seguidamente, se adiciona a cada matraz, de acuerdo con el siguiente orden:

- 7 ml. de agua destilada.
- 1 ml. de molibdato amónico al 2'5% (W/v).
- 1 ml. de ácido ascórbico al 10% (W/v).

Introduciéndose los matraces inmediatamente en un baño de agua hirviendo durante 7 minutos, al cabo de los cuales se detiene la reacción por inmersión de dichos matraces en un baño de hielo, leyéndose finalmente las densidades ópticas a 820 m  $\mu$  en fotocolorímetro Spectronic 20.

Los valores de fósforo de cada fosfolípido, se obtuvieron por comparación de las densidades ópticas, obtenidas frente a las de una curva patrón construida utilizando una solución de  $\text{PO}_4\text{Na}_3$  de concentración 2  $\mu\text{g}$  de fósforo/ml. y siguiendo el mismo proceso descrito, a excepción del paso previo de mineralización a que se sometieron las muestras conteniendo el fósforo orgánico.

En ambos casos, las densidades ópticas se leerán frente a un blanco constituido por:

- 0'9 ml. de ác. perclórico al 70%.
- 7 ml. de agua destilada.
- 1 ml. de molibdato amónico al 2'5%.
- 1 ml. de ácido ascórbico al 10%.

Calentado igualmente 7 minutos a 100° C. en baño de agua. Este método es sensible para cantidades de fósforo comprendidas entre 1 y 8 ug por muestra; teniendo que procederse a la dilución de las cantidades que presentan valores superiores a éstos, confrontando entonces los valores obtenidos frente a una curva patrón realizada con la misma dilución.

#### ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO OPTICO Y ULTRAMICROSCOPICO

Este se llevó a cabo, como hemos expuesto anteriormente, tanto a nivel del polo de sección, producto de la hepatectomía, como en el parénquima distal.

##### A) Estudio óptico

Todas las muestras seleccionadas para microscopía óptica se fijaron en una solución de formalina neutra al 10%. El hígado se cortó en rodajas de 4 mm. después de permanecer algunos días en el fijador y, tras deshidratación en alcoholes de concentración creciente, se incluyeron en parafina.

A continuación se practicaron cortes de 5 micras, se deshidrataron, siguiendo en sentido inverso los pasos realizados para la inclusión y, sobre estos cortes, se realizaron las diferentes técnicas con arreglo a la siguiente pauta:

Cada corte se tiñe con hematoxilina durante tres minutos, lavándose a continuación en agua; posteriormente se introduce en solución de eosina unos 12 minutos; seguidamente, cada corte se lava ligeramente en agua, se deshidrata por pases de alcohol de concentración creciente, se aclara con xilol y se monta en bálsamo del Canadá.

Se efectuaron asimismo en cada corte, tinciones de PAS, específica para fibras de reticulina (Wilder) y tricrómico de Masson. Del mismo modo, cuando las circunstancias lo aconsejaron, se incorporaron tinciones de Sudán, Perls y PAS-amilasa.

#### B) Estudio ultramicroscópico

Las muestras seleccionadas a tal efecto, se introdujeron en una solución de glutaraldehído a 4°C., para comenzar seguidamente el proceso de inclusión.

Del fragmento hepático, se toma una pequeña parte seleccionada y se trocea convenientemente, ayudados de gafas de aumento y cuchilla especial, procesándose a continuación de la siguiente manera:

Los microbloques se fijan durante dos horas a 4° C. en un líquido compuesto de 6 partes de glutaraldehído (25%) y 1 de buffer de Millonig. pH 7'3.

A continuación se lavan en buffer de Millonig y se tienen una hora y media en el medio de Palade (pH 7'2), lavándose después mediante varios pases por este último buffer.

Para el proceso de inclusión, los microbloques se deshidratan en acetonas de concentraciones sucesivamente crecientes, efectuando finalmente dos pases, de treinta minutos cada uno, por óxido de propileno e introduciéndose

a continuación en una estufa a 50°C., en una mezcla de óxido de propileno y araldita I a partes iguales, donde permanece 24 horas y posteriormente en araldita II durante 2 horas.

Los bloques así hechos, se cortan en un ultramicrotomo LKB y se montan en rejillas de cobre sin películas.

Los cortes se tiñen con acetato de uranilo durante 10 minutos, se hidratan mediante pase por alcohol metílico (75%) y por agua destilada, contrastándose con nitrato de plomo, quedando así listos para ser observados en los microscopios electrónicos Zeiss EM-10B (potencial de aceleración 80 Kv; capacidad de resolución 250-500.000 aumentos directos; contaminación:  $0.2 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}/\text{h}$ ; diafragma de objetivo 50 nm.), e Hitachi HU-12A (potencial de aceleración de 75 Kv; capacidad de resolución 600.300.0000 aumentos directos; contaminación  $0.1 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}$ ; diafragma de objetivo 10 nm).

#### Soluciones

##### 1- Buffer de Millonig, pH 7.3

Sol. A.- Fosfato monosódico..... 2.26 g.  
Agua destilada..... 100 c.c.

Sol. B.- Hidróxido sódico..... 2.52 g.  
Agua destilada..... 100 c.c.

Sol. C.- Glucosa..... 4.45 g.  
Agua destilada..... 100 c.c.

41.5 c.c. de Sol. A + 8 c.c. de Sol. B + 5 c.c. de Sol. C.

2.- Solución de Palade, pH 7'2

Tetróxido de ósmio al 2%..... 10 c.c.

Buffer de Palade..... 10 c.c.

3.- Buffer de Palade, pH 7'2

Acetato sódico , 1'904%..... 10 c.c.

Veronal sódico, 2'58%..... 10 c.c.

Clorhídrico, 0'1%..... 10 c.c.

Agua destilada..... 20 c.c.

4.- Oxido de Propileno.

5.- Araldita I

Endurecedor, 1°..... 10 c.c.

Resina, 2°..... 10 c.c.

Plastificante, 3°..... 0'5 c.c.

6.- Araldita II.

Araldita I + Acelerador 0'4 c.c.

7.- Acetato de Uranilo a saturación.

8.- Nitrato de plomo (disolviendo con NaOH 1 N hasta pH 12)

Citrato sódico..... 1'76 g.

Nitrato de plomo..... 1'37 g.

Agua destilada..... 30 c.c.



**R E S U L T A D O S**  
=====

#### EVOLUCION DE LOS ANIMALES

A lo largo del proceso se registró una pérdida de peso máxima de  $7'8 \pm 2'4\%$  a las 48 horas, recuperándose los valores preoperatorios en la segunda semana, habitualmente, entre los 7 y 14 días.

El hígado en regeneración exhibía una coloración pálida, no pigmentada y al tacto presentaba una mayor consistencia que el hígado normal, características que no se apreciaban a los 7 días.

El polo de sección evolucionaba según los patrones de un infarto parenquimatoso, adoptando finalmente una coloración amarillenta, exponente del fenómeno cicatricial a dicho nivel (Fotos C, D y E).

Estos últimos hallazgos, habría que referirlos a la sutura efectuada en dicha zona para impedir la hemorragia hepática postoperatoria.

Con el fin de lograr una mayor claridad expositiva, analizaremos los resultados obtenidos de acuerdo con los diferentes parámetros determinados en nuestro trabajo experimental.

Según esto, distinguiremos:



188

Foto C.- Hígado en regeneración- 24 horas (ver texto)



Foto D.- Hígado en regeneración- 48 horas(ver texto)

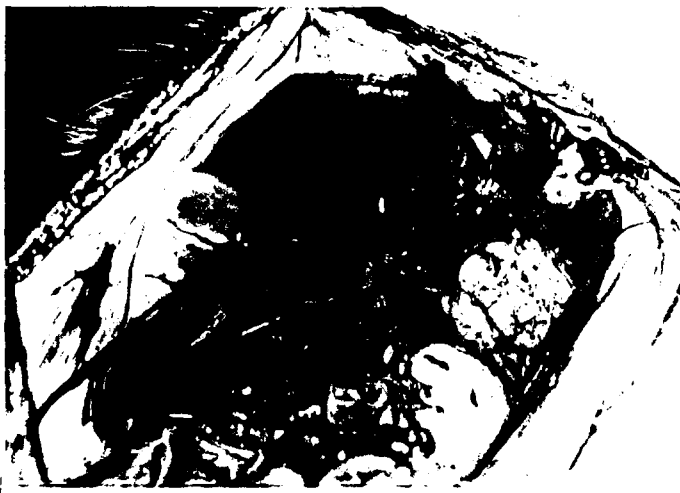


Foto E.- Hígado en regeneración- 7 días (ver texto)

GRUPO A: DETERMINACIONES HORMONALES

Glucagón	Sangre portal
	Sangre suprahepática
Insulina	Sangre portal
	Sangre suprahepática

GRUPO B: DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

1.- Fraccion microsomal	Citocromo P <sub>450</sub>	Polo distal
		Polo de sección

Proteínas	Polo distal
	Polo de sección

Lípidos totales	Polo distal
	Polo de sección

Fosfolípidos	Polo distal
	Polo de sección

2.- Fracción mitocondrial

Fosfatasa acida lisosomal.	Polo distal
	Polo de sección

Proteínas	Polo distal
	Polo de sección

CORRELACION MORFOLOGICA

Optica  
Ultramicroscópica.

## DETERMINACIONES HORMONALES

### Glucagón

#### 1.- Sangre portal.

Los niveles de glucagón en sangre portal se encuentran ya elevados significativamente una hora después de la resección hepática, alcanzando su pico máximo a las 6 horas y manteniéndose aún a las 24 horas estos altos niveles.

A las 48 horas, persisten aún los niveles elevados; mas, sensiblemente disminuídos respecto a las anteriores determinaciones. Por último, tanto a las 72 horas como a los 7 días, los valores eran superponibles a los basales. ( Tabla I, Tabla II y Gráfica 1).

#### 2.- Sangre suprahepática.

Si bien las tasas de glucagón a dicho nivel suelen experimentar las oscilaciones descritas a nivel portal, la amplitud de éstas es sensiblemente menor. ( Tabla I, Tabla II y Gráfica 2).

La valoración estadística de los resultados se ha efectuado según Lamotte (389).

## GLUCAGON pg/ml

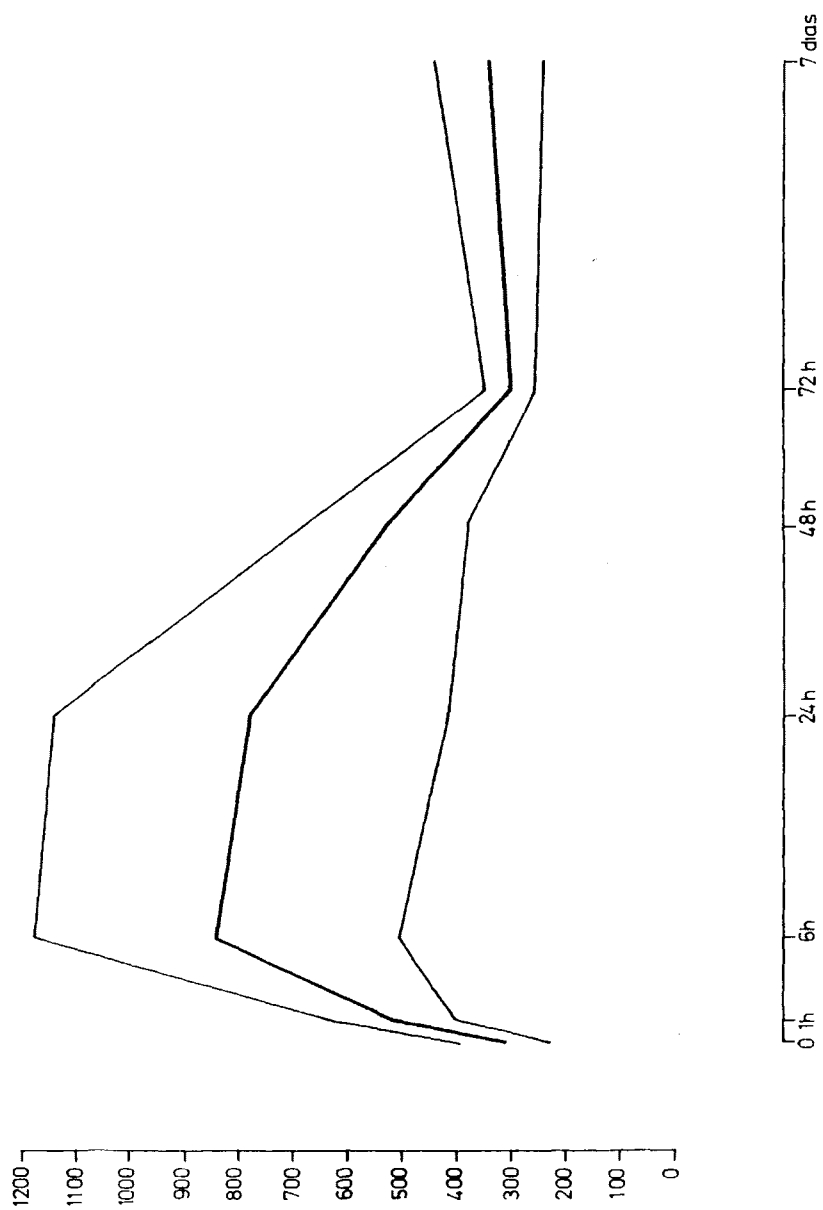
RATA N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Controles S.P.	570	300	290	330	190	330	410	250	170	300
S. SH.	200	380	230	190	110	170	380	180	180	150
1 hora S.P.	440	600	700	300	310	540	780	500	600	400
S. SH.	110	340	260	250	170	200	170	200	370	260
6 horas S.P.	1920	780	310	1230	370	900	820	850	450	800
S. SH.	620	290	220	250	220	360	250	400	360	300
24 horas S.P.	810	1210	850	700	400	2000	430	250	750	440
S. SH.	340	180	180	240	240	350	210	290	270	320
48 horas S.P.	960	600	420	350	660	230	570	470	720	380
S. SH.	490	260	280	160	190	190	310	250	280	380
72 horas S.P.	230	280	320	460	310	250	340	270	320	280
S. SH.	180	140	210	250	260	220	210	140	250	150
7 días S.P.	370	360	340	150	600	370	250	330	180	530
S. SH.	110	120	130	130	150	210	180	220	190	260

TABLA - I

	$\bar{X}$	S	Sm	I.C. 95%	
CONTROLES S.P.	314	107,9073677	35,96912256	81,29021699	232-39
S. SH.	217	86,72369918	28,90789973	65,33185338	151-28
1 hora S.P.	517	150,6021248	50,20070827	113,4536007	403-63
S. SH.	252	84,23775875	28,07925292	63,4591116	188-31
6 horas S.P.	843	445,1527828	148,3842609	335,3484297	507-11
S. SH.	327	114,1095964	38,03653215	85,96256265	241-41
24 horas S.P.	784	484,7308532	161,5769511	365,1639094	418-11
S. SH.	262	59,29586832	19,76528944	44,66955414	217-30
48 horas S.P.	536	201,1566554	67,05221846	151,5380137	384-68
S. SH.	279	93,21480569	31,0716019	70,22182029	208-34
72 horas S.P.	306	60,69596362	20,23198787	45,7242926	260-35
S. SH.	201	43,92038251	14,6401275	33,08668816	167-23
7 días S.P.	348	132,3480261	44,11600868	99,70217963	248-44
S. SH.	170	47,32863826	15,77621275	35,65424083	134-20

N = 10

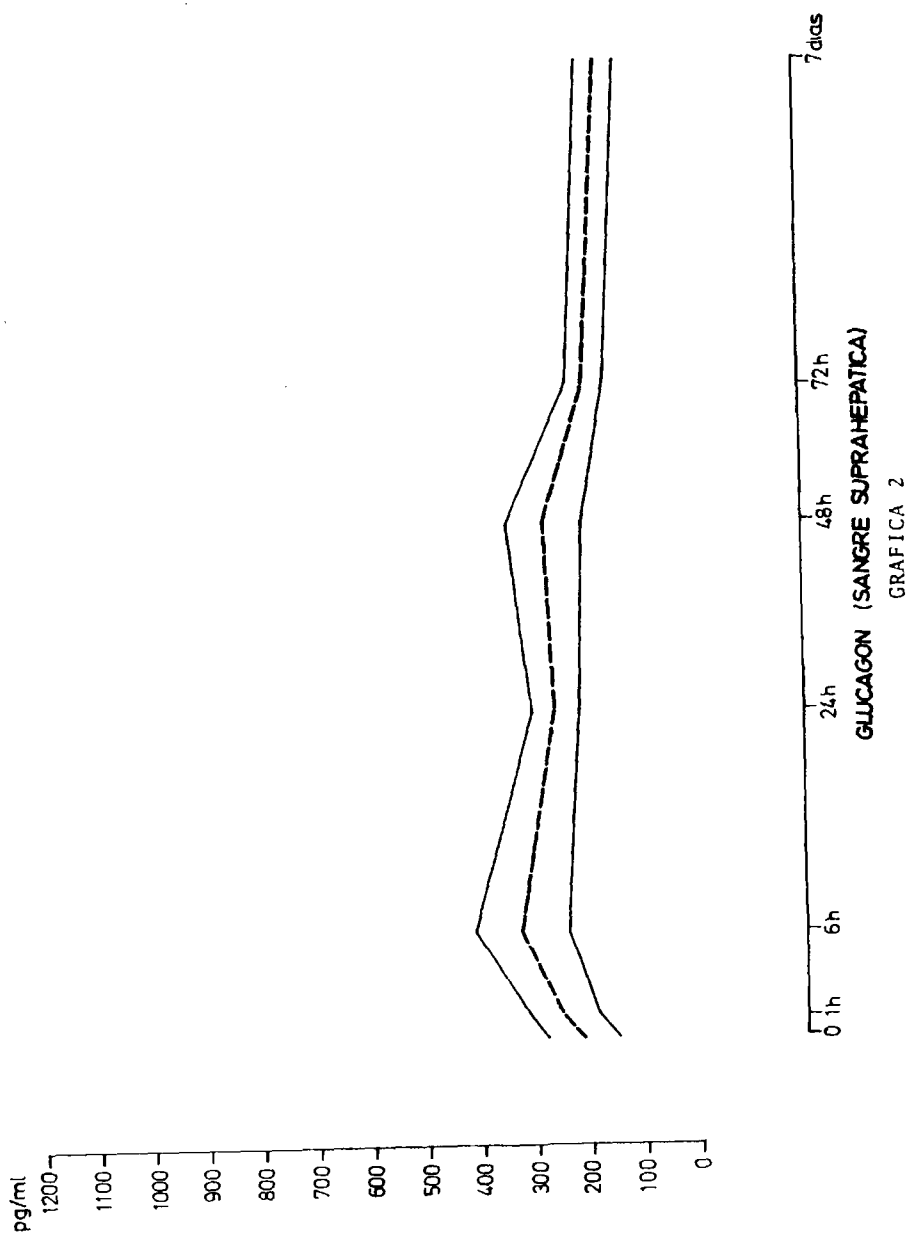
TABLA - II : Valoración estadística.

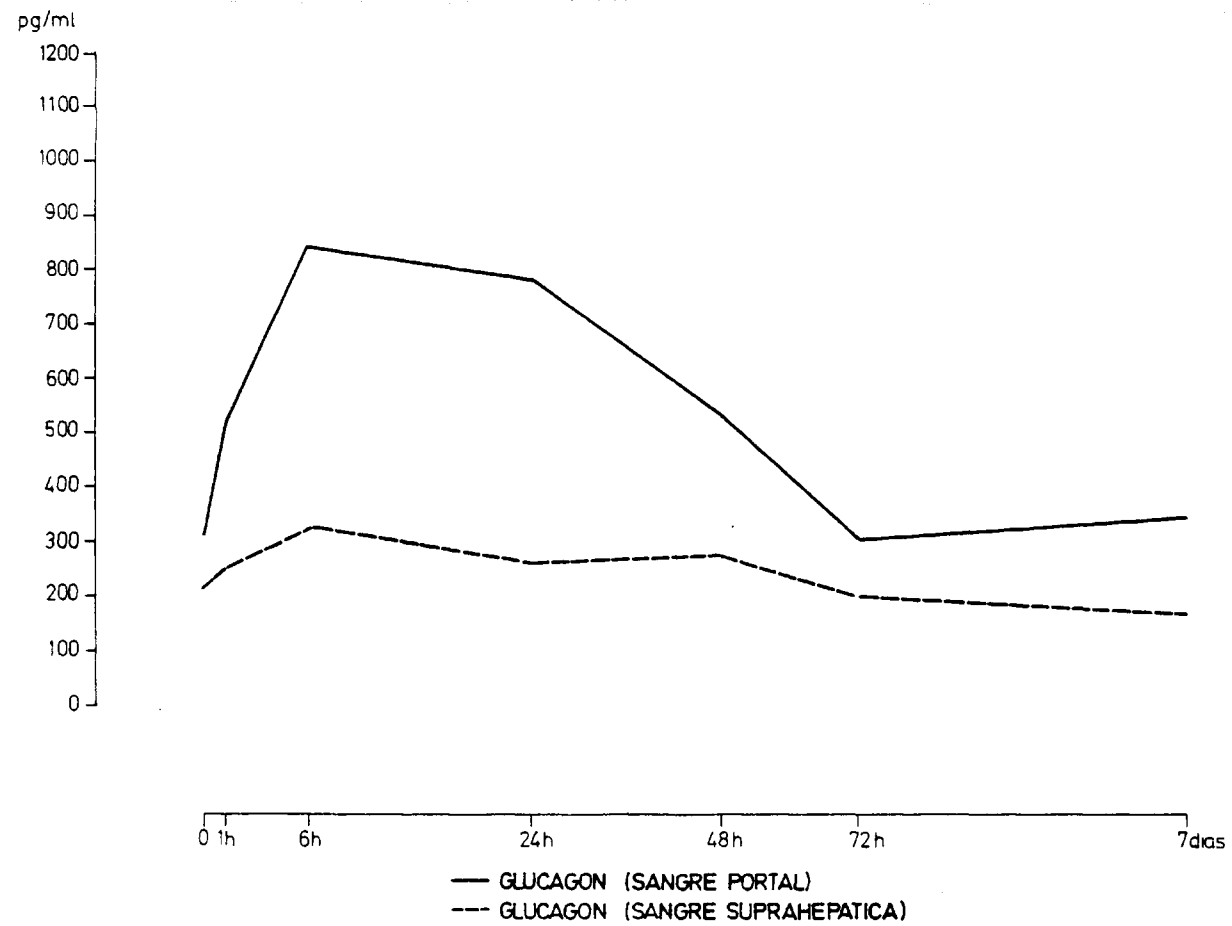


GLUCAGON (SANGRE PORTAL)

GRAFICA 1







GRAFICA 5

195

### Insulina

#### 1.- Sangre portal

Después de un discreto incremento previo, registrado a la primera hora, las tasas de insulina experimentaron un notable descenso a las 6 horas de la intervención.

A las 24 y 48 horas, los niveles de insulina se encontraban discretamente elevados en relación a los valores hallados a las 6 horas, sin alcanzar los niveles basales.

A las 72 horas se registraron los índices más bajos, iniciándose una tendencia hacia la normalidad, no habiéndose recuperado aún los niveles basales a los 7 días.

( Tabla III, Tabla IV y Gráfica 4 ).

#### 2.- Sangre suprahepática

A nivel suprahepático, se registra una discreta disminución a la primera hora, que persiste a las 6 horas de la resección hepática.

Se inicia posteriormente un retorno a las cifras basales, sin observar variaciones significativas respecto a los controles en el resto de las determinaciones efectuadas (24,48,72 horas y 7 días) ( Tabla III, Tabla IV y Gráfica 5 ).

La valoración estadística de los resultados se ha efectuado según Lamotte (389).

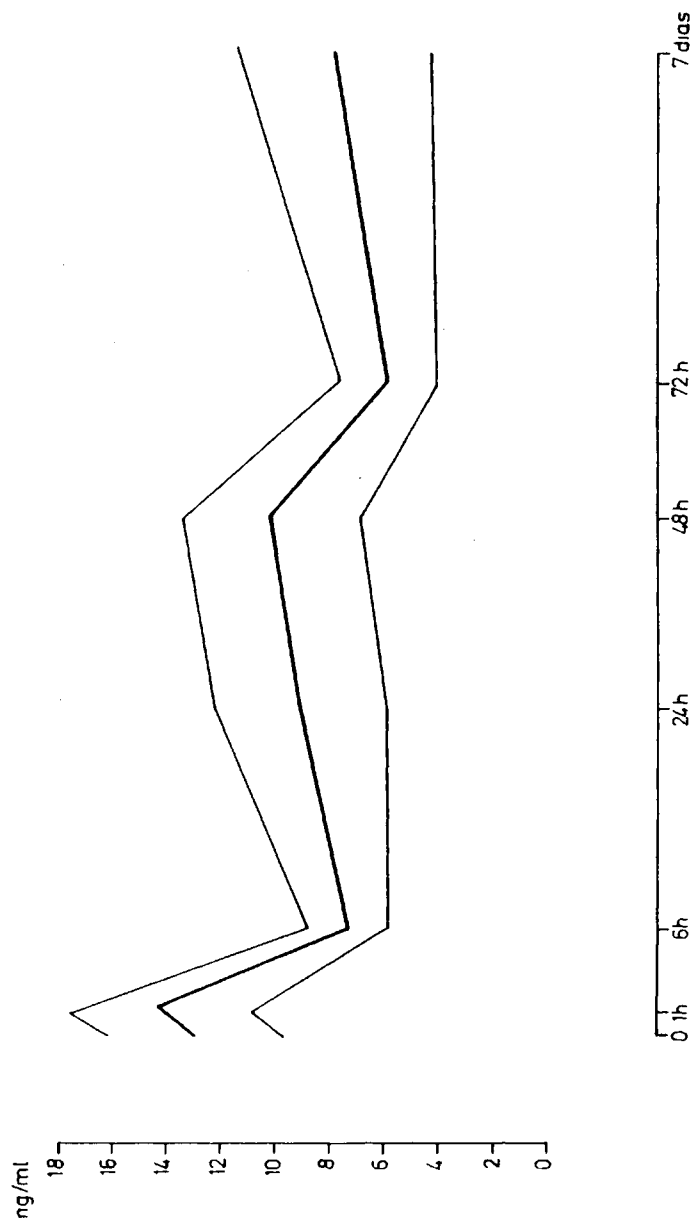
## INSULINA ng./ml.

RATA N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NTROLES	P. 7'7	20	10'3	15'7	7'6	11'2	10	20'1	12'3	14'8
	,		,	,	,	,	,	,	,	,
hora	P. 19'5	14'9	18'5	8'1	15'5	15'3	19'3	13'2	5'2	13'6
	,		,	,	4	,	,	,	,	,
horas	P. 6'7	4'9	8'1	11'4	6'7	4'3	6'9	8'2	7'3	10'1
	S.H. 2'6	1'5	1'5	2'9	3'1	2'1	2'1	3'5	4'3	3'1
4 horas	P. 9'7	8'1	9'3	8'9	5'3	6'1	21'1	8'1	8'5	6'3
	S.H. 4'6	3'6	5'7	5'2	7	3'2	7'5	2'4	4'1	5'9
8 horas	P. 13	10'1	11'8	9'2	4'1	3'9	10'8	9'6	20'3	9'4
	S.H. 1'9	5'1	0'6	3'6	1'4	1'7	6'6	7'7	7'5	8'1
2 horas	P. 3'8	4'2	3'2	2'9	7	10'4	5'3	7'1	6'9	8'7
	S.H. 2'6	3'1	1'8	2'4	4'3	8'3	3'5	1'4	5'9	4
7 días	P. 2'2	8'8	7'9	5'6	3'1	8'8	10'2	7'1	5'2	20'3
	S.H. 1'4	4'8	4'5	8	1'3	3'9	4'7	3'6	3'9	6'2

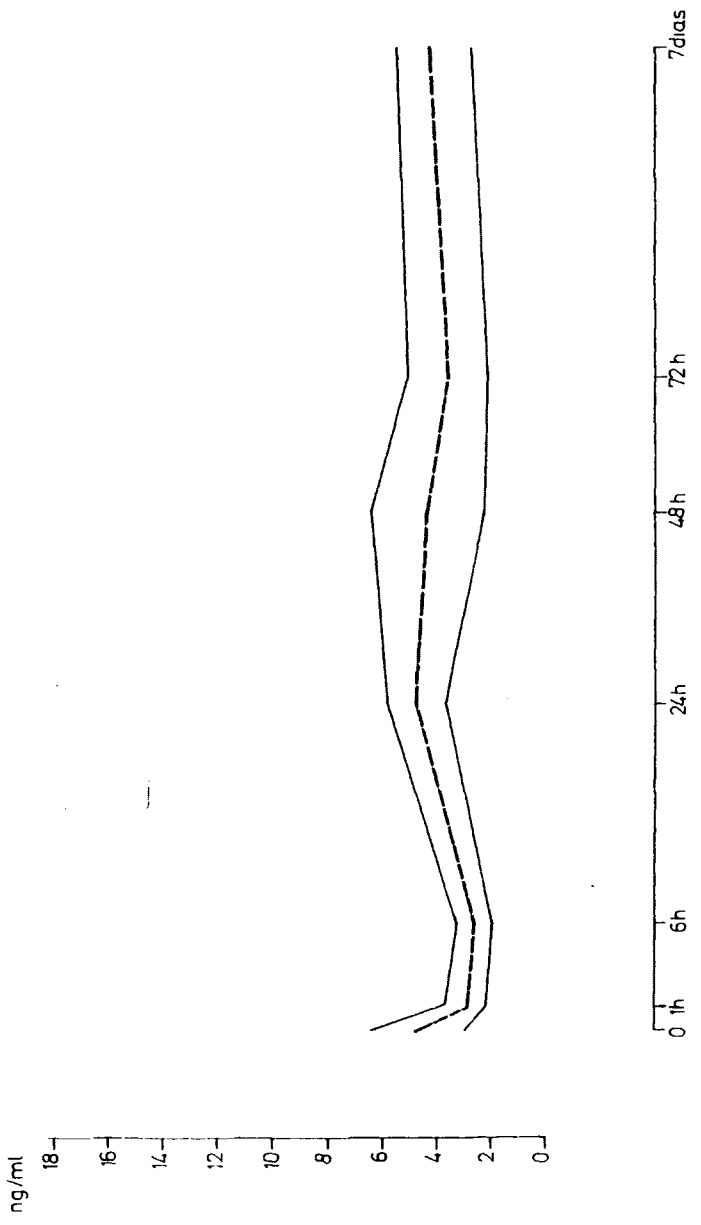
TABLA - III

	X	S	Sm	I	%
NTROLES	P. 12'97	4'326673087	1'442224362	3'259427059	9'7-16'2
	S.H. 4'8	2'1	,	,	- ,
hora	P. 14'33	4'425618601	1'4752062	3'333966013	10'9-17'
	S.H. 2'98	1'020588066	0'3401960219	0'7688430095	2'2-3'7
horas	P. 7'46	2'036762136	0'6789207121	1'534360809	5'9-8'9
	S.H. 2'67	0'8462269199	0'28207564	0'6374909463	2-3'3
horas	P. 9'14	4'219763027	1'406587676	3'178888147	5'9-12'3
	S.H. 4'92	1'563841424	0'5212804747	1'178093873	3'7-6
horas	P. 10'22	4'378081772	1'459360591	3'298154935	6'9-13'5
	S.H. 4'42	2'777336854	0'9257789513	2'09226043	2'3-6'5
2 horas	P. 5'95	2'359343129	0'7864477096	1'777371824	4'1-7'7
	S.H. 3'73	1'965731416	0'6552438053	1'480805	2'2-5'2
7 días	P. 7'92	4'789739033	1'596579678	3'608270071	4'3-11'5
	S.H. 4'23	1'89528362	0'6317612066	1'427780327	2'8-5'6

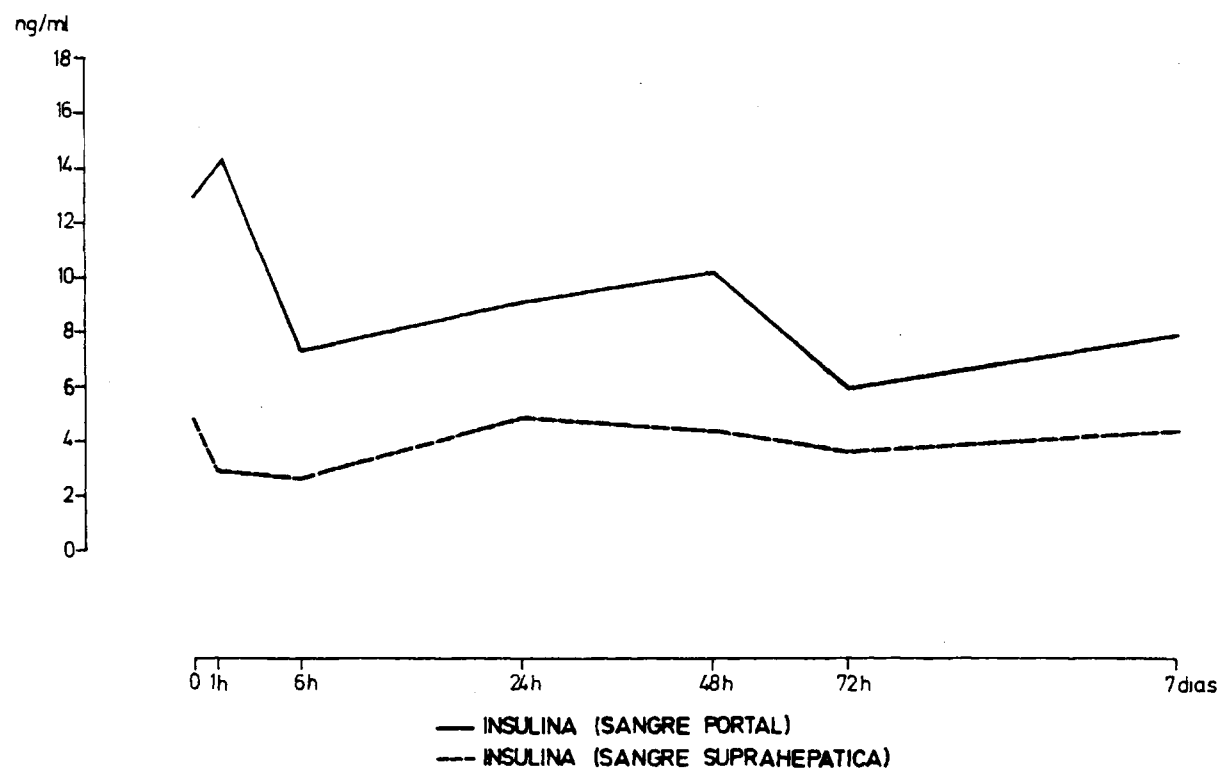
TABLA - IV: Valoración estadística.



INSULINA (SANGRE PORTAL)  
GRAFICA 4



INSULINA (SANGRE SUPRAHEPÁTICA)  
GRÁFICA 5



GRAFICA 6

## DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

### 1.- Fracción microsomal

Citocromo P<sub>450</sub> :- Los niveles de P<sub>450</sub> se han referido a los valores de proteínas microsomales; de esta forma, la valoración de dicho citocromo se ha expresado en nmoles/mg. de proteína microsomal.

En el parénquima distal a la zona de resección, se aprecia ya a las 6 horas, una disminución de los niveles de P<sub>450</sub>, que es aún más acusada a las 24 horas. Después de un pequeño incremento a las 48 horas, se registra una nueva disminución hasta los 7 días. Seguidamente, parece iniciarse una tendencia a la normalidad, sin que a los 14 días se hayan alcanzado los niveles basales (Tabla V, Gráfica 7).

En el polo de sección, los valores obtenidos a las 6 horas representan tan sólo una tercera parte de los basales, permaneciendo sensiblemente disminuídos en las siguientes determinaciones (24, 48 y 72 horas), para hacerse finalmente indetectables a los 7 y 14 días. (Tabla V, Gráfica 8).

Proteínas microsomales:- La valoración de las proteínas microsomales se ha referido en relación al tejido hepático; de este modo, quedan expresadas en mg de proteína microsomal/g. de hígado.



CITOCROMO P<sub>450</sub> n.moles/mg. prot. microsom.

	Basal			6. horas	24 h.	48 h.	72 h.	7 dias	14 dias
Exp. 1	0'66	P. distal	Exp. 1	0'412	0'24	0'37	0'26	0'1648	0'2472
Exp. 2	0'63		Exp. 2	0'428	0'26	0'39	0'31	0'15	0'274
$\bar{X}$	0'645		$\bar{X}$	0'420	0'25	0'38	0'285	0'157	0'260
		P. sección	Exp. 1	0'219	0'15	0'24	0'20	no detec.	no detec.
			Exp. 2	0'214	0'17	0'22	0'20	no detec.	no detec.
			$\bar{X}$	0'216	0'16	0'23	0'20	no detec.	no detec.

TABLA - V

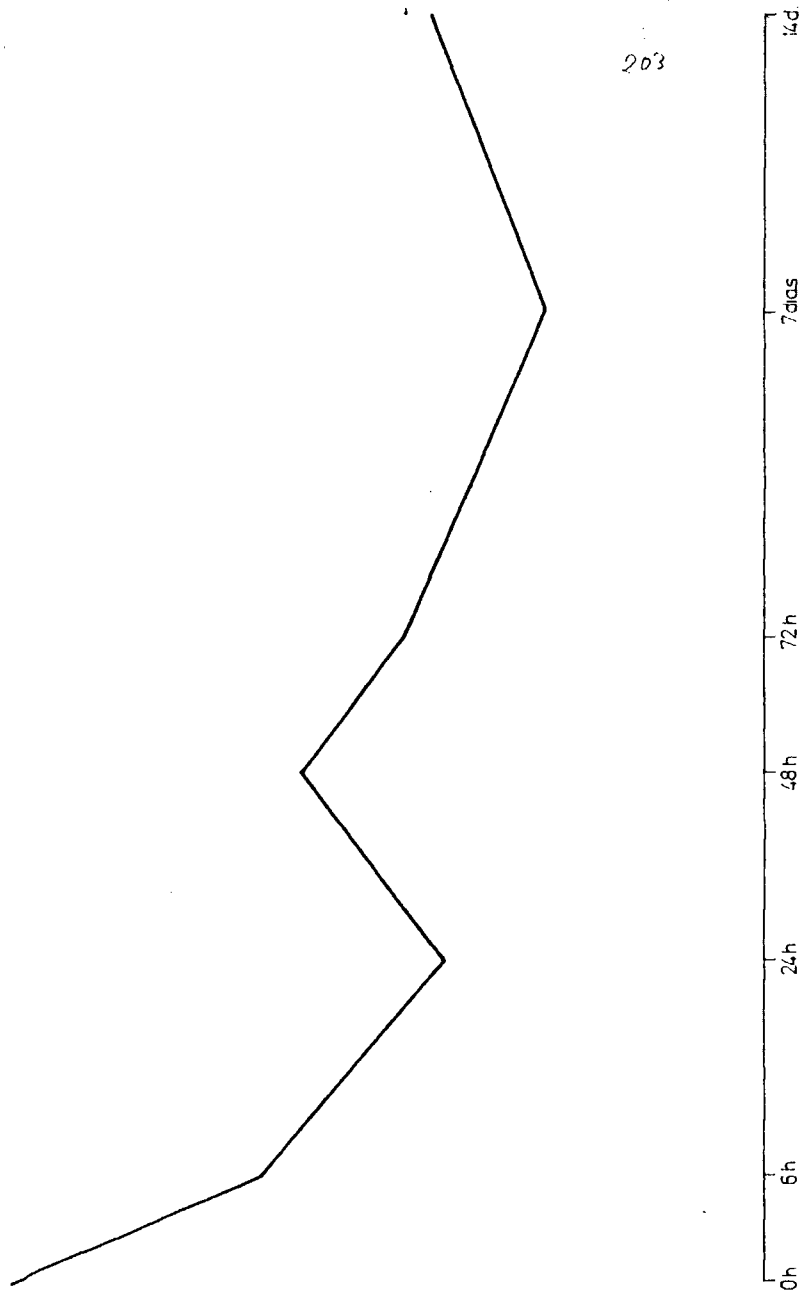
## Prot. Micros. mg/g. hígado

	Basal			6 horas	24 h.	48 h.	72 h.	7 dias	14 dias
Exp. 1	21'9	P. distal	Exp. 1	22'44	25	13'57	15'8	19'71	23
Exp. 2	20'5		Exp. 2	21'94	25'4	12'54	18'2	19'3	23'2
$\bar{X}$	21'2		$\bar{X}$	22'23	25'2	13'05	17	19'5	23'1
		P. sección	Exp. 1	11'32	17'3	12'65	15'2	11'39	17'36
			Exp. 2	11'1	15	9'63	15	11'1	17'1
			$\bar{X}$	11'21	16'1	11'14	15'1	11'24	17'23

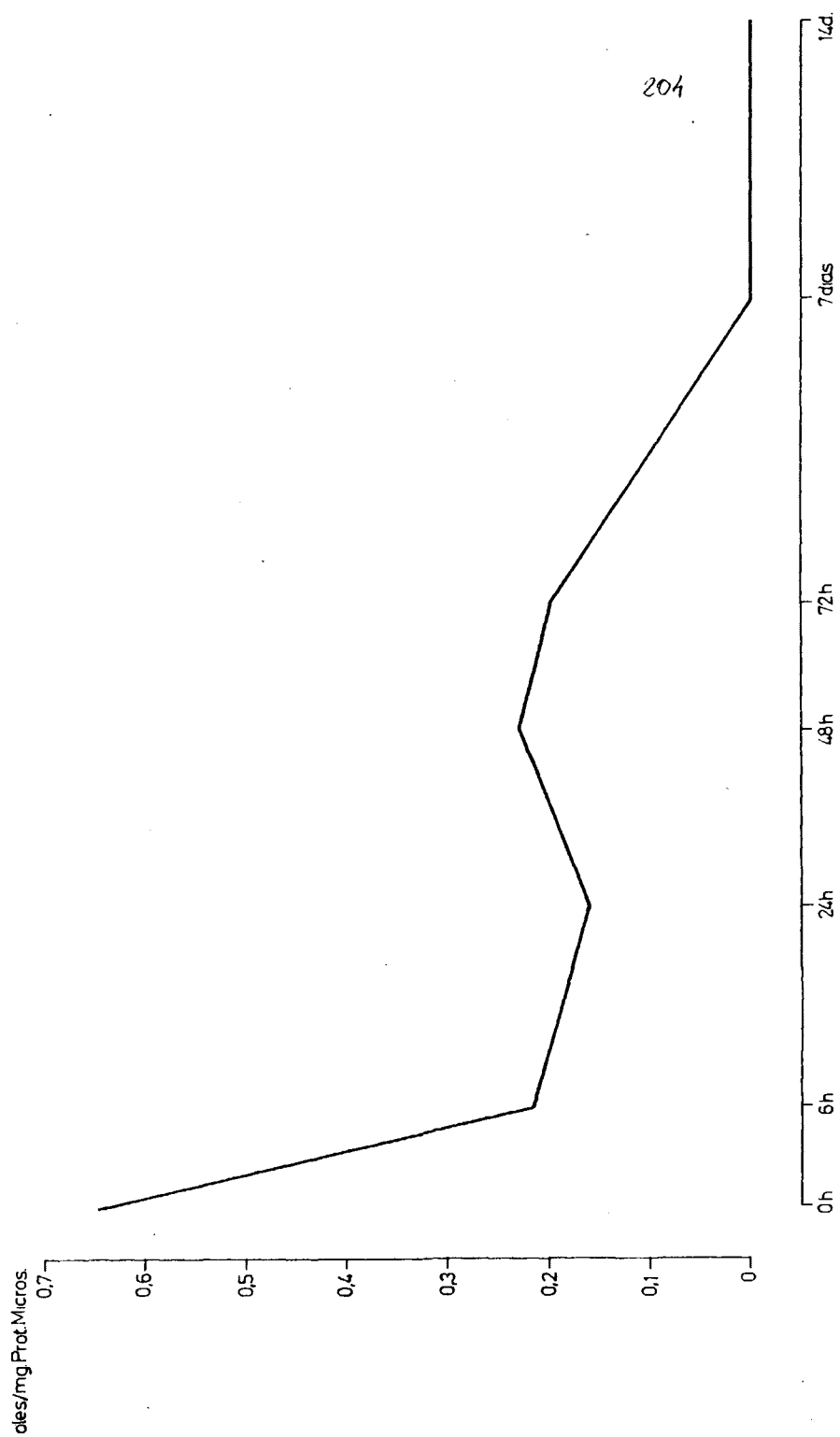
TABLA - VI

nm es mg

0,7  
0,6  
0,5  
0,4  
0,3  
0,2  
0,1  
0

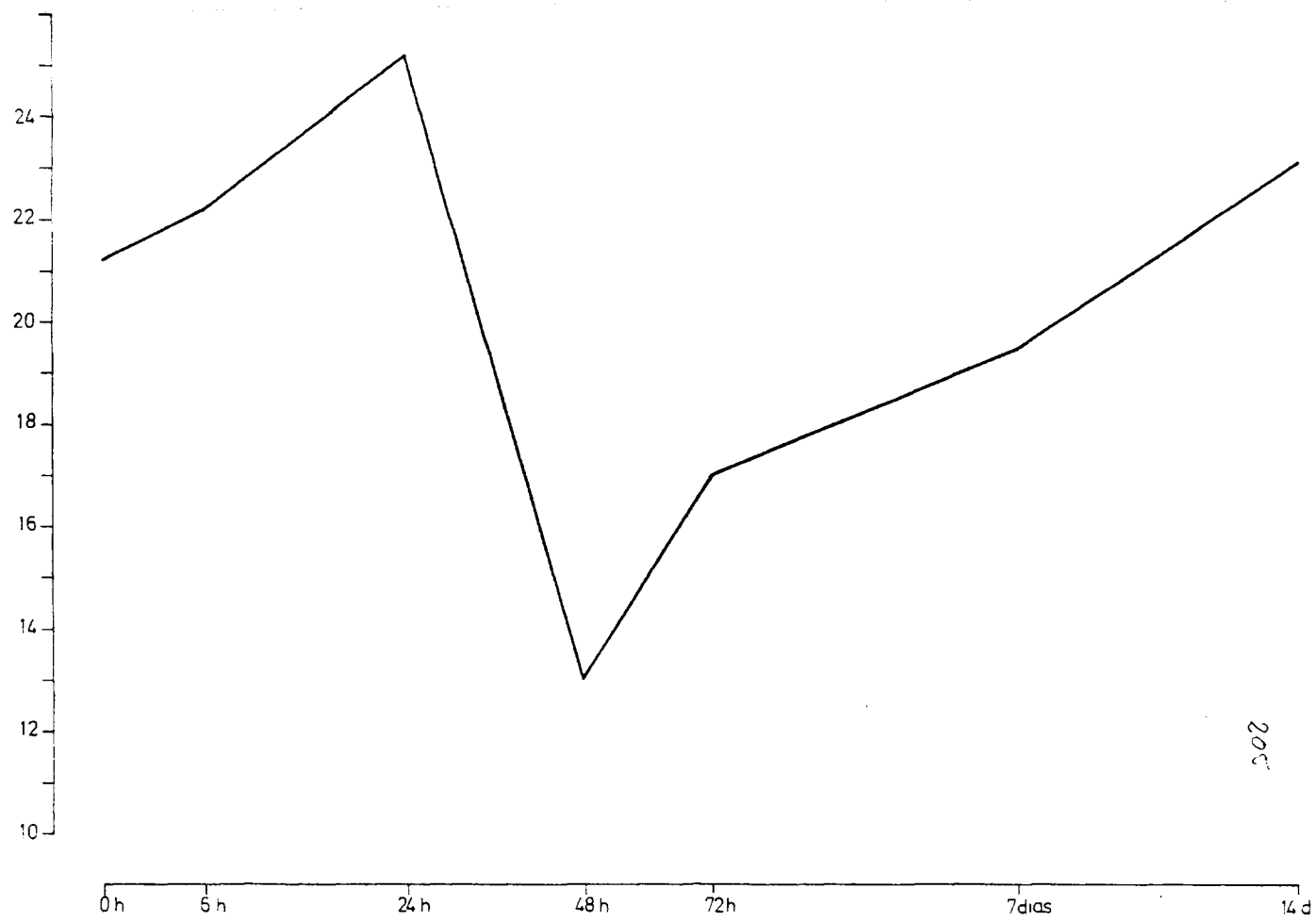


CITOCROMO P<sub>450</sub>. POLO DISTAL.  
Gráfica



CITOCROMO P<sub>450</sub>. POLO DE SECCION.

Gráfica 8



Gráfica 9

PROTEINAS MICROSOMALES. POLO DISTAL.

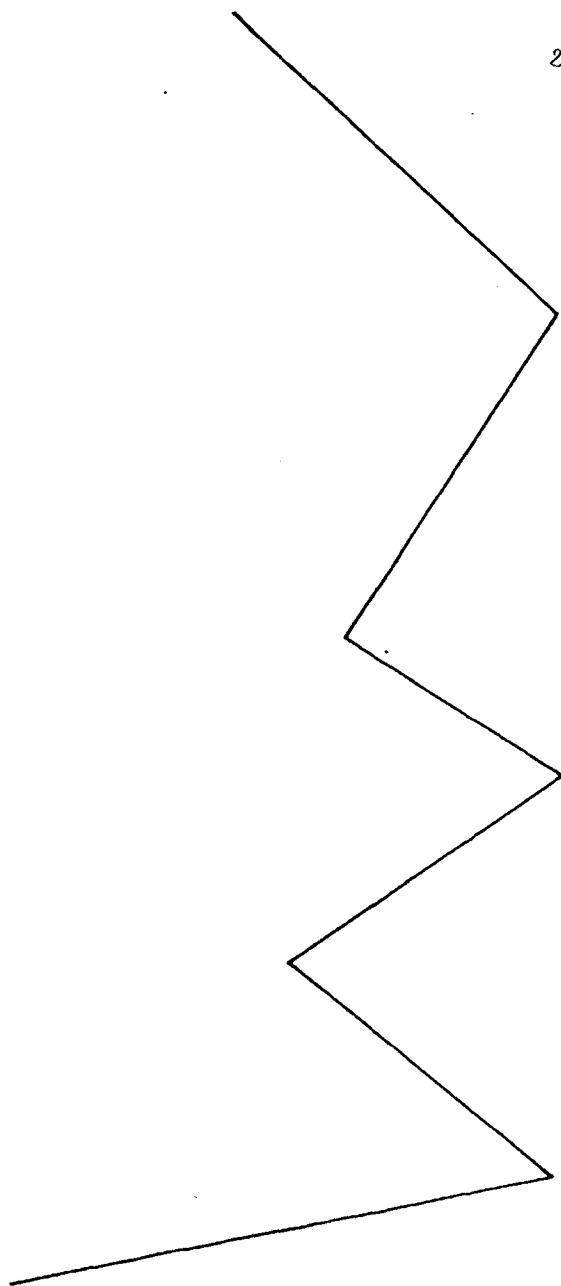
205

t.Marcos mg/g T.Hepático

26  
24  
22  
20  
18  
16  
14  
12  
10

0 h 6 h 24 h 48 h 72 h 7 dias 14 d

206



En el polo distal, existe un incremento de las proteínas a las 6 horas, alcanzando un máximo a las 24 horas. Posteriormente se registra una notable disminución a las 48 horas, para incrementar en las restantes determinaciones, alcanzándose los valores normales e incluso superándolos a los 14 días. (Tabla VI, Gráfica 9).

En el polo de sección, sin embargo, se registra una disminución más acusada, que persiste en el resto de la experiencia, sin recuperarse los valores basales al cabo de los 14 días. (Tabla VI, Gráfica 10).

Lípidos totales:- Estos se han referido, al igual que las proteínas, al tejido hepático; por consiguiente, la valoración de éstos vendrá expresada en mg. de lípidos totales microsomaes/g. de hígado.

En el polo distal, los lípidos totales extraídos de la fracción microsomal, registran un pequeño incremento a las 24 horas para presentar posteriormente (48 y 72 horas), una disminución a los 2/3 aproximadamente de las cifras basales. (Tabla VII, Gráfica 11).

En el polo de sección, sin embargo, la reducción de los valores basales ya era acentuada a las 24 horas, suponiendo la mitad aproximadamente de los controles. En el resto de las determinaciones efectuadas, los valores obtenidos eran muy aproximados. (Tabla VII, Gráfica 12).

## Lip.tot. microsom. mg/g. hígado

	Basal			24 h.	48 h.	72 h.
Exp.1	11'95	Polo distal	Exp.1	11'29	9'89	7'44
Exp.2	11'85		Exp.2	12'19	7'41	8
$\bar{X}$	11'90		$\bar{X}$	12'24	8'65	7'72
		Polo de sección	Exp.1	7'39	7'46	6'82
			Exp.2	6'23	5'33	6'78
			$\bar{X}$	6'81	6'39	6'80

TABLA - VII

## Fosfolípidos microsom.

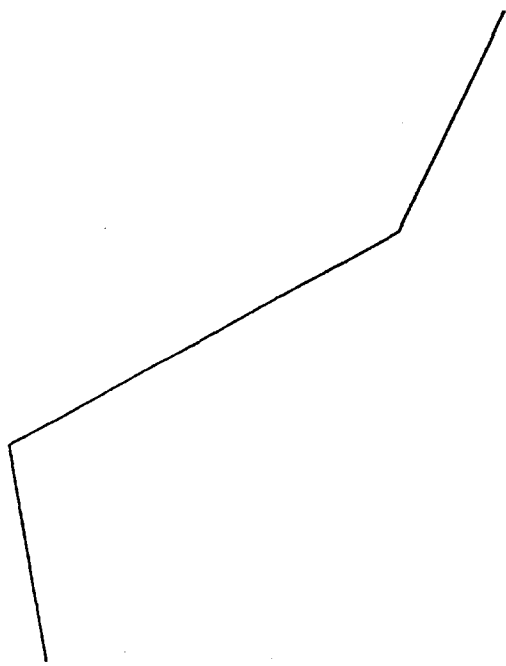
## µg. P. Lipid./g. hígado

	Basal			24 h.	48 h.	72 h.
Exp.1	251	Polo distal	Exp.1	280	250	208
Exp.2	246		Exp.2	293	199	203
$\bar{X}$	248		$\bar{X}$	286	224	205
		Polo de sección	Exp.1	184	173	188
			Exp.2	154	135	163
			$\bar{X}$	169	154	175

TABLA - VIII

L: Micros mg/g Heparico

13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6

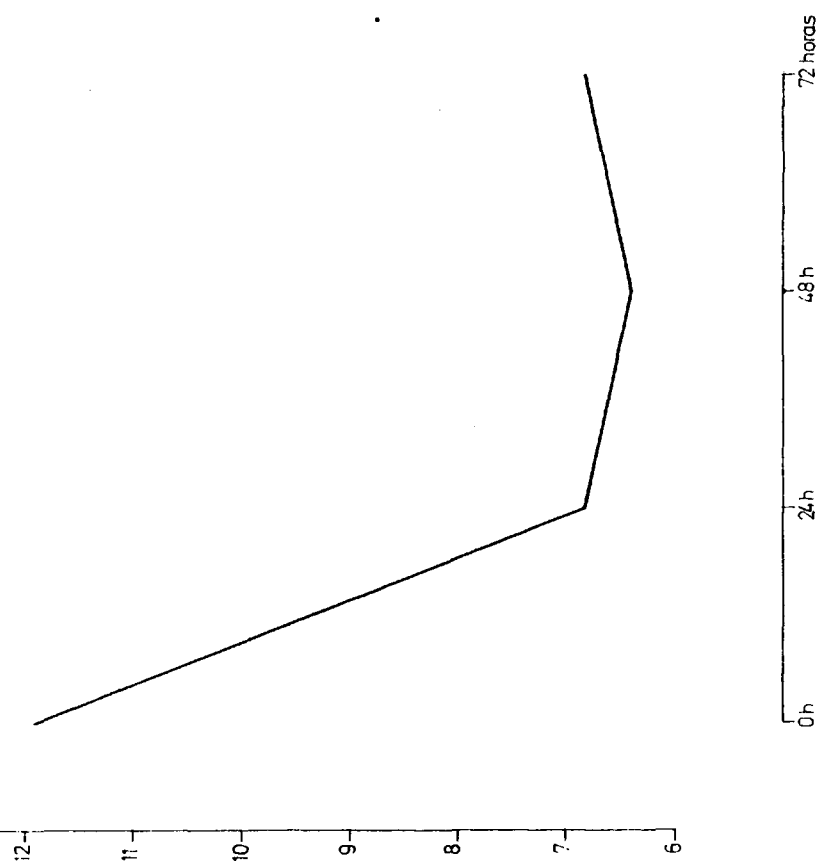


0h 24h 48h 72 horas

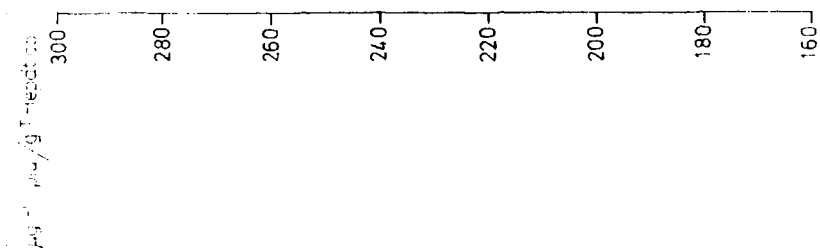
LÍPIDOS TOTALES MICROSOMALES. POLO DISTAL.  
Gráfica 11



LT Micros mg/g T Hielatico

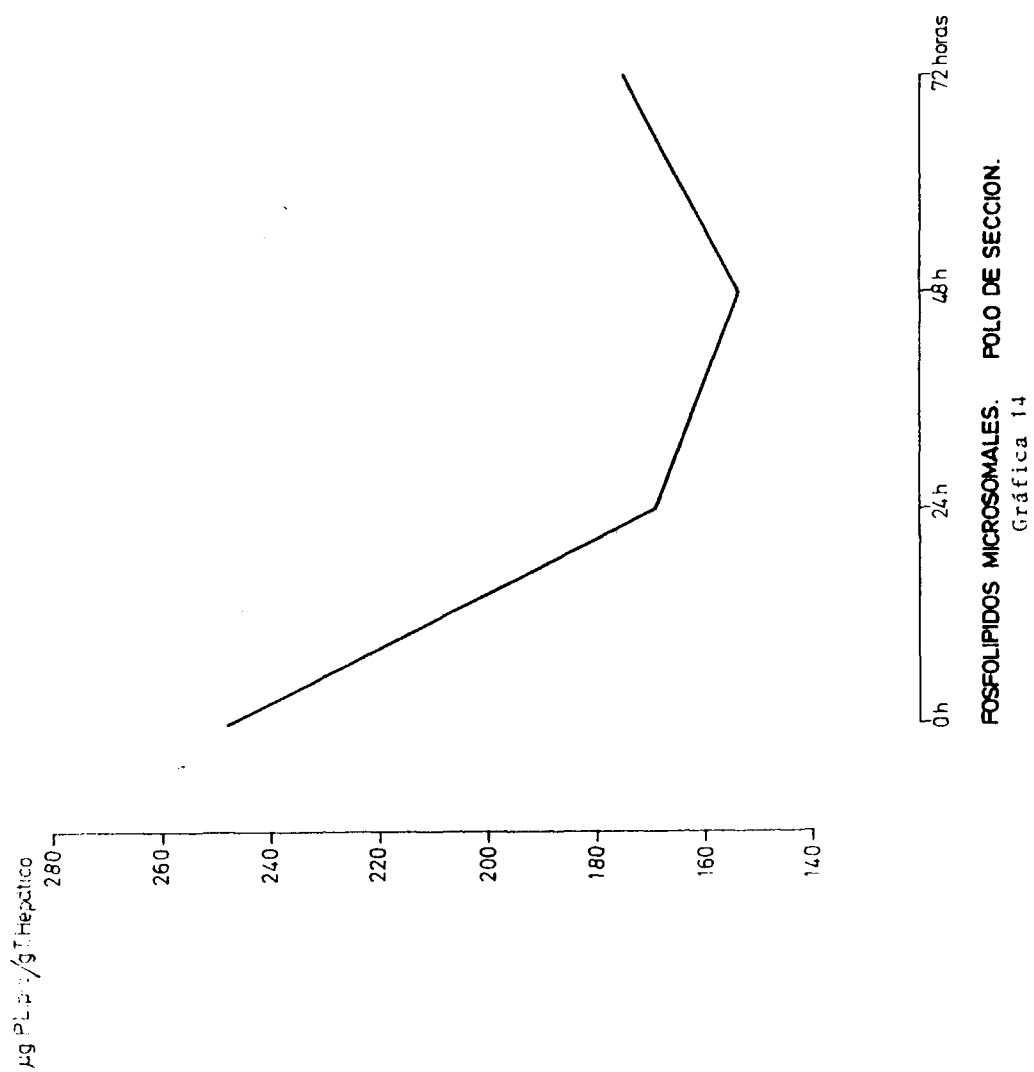


LÍPIDOS TOTALES MICROSOMALES. POLO DE SECCION.  
Gráfica 12



0h 24h 48h 72 horas

**FOSFOLIPIDOS MICROSONALES. POLO DISTAL.**  
Gráfica 13



Fosfolípidos:- Estos se han referido, al igual que los dos parámetros anteriores, al tejido hepático; así pues su valoración viene expresada en  $\mu\text{g P lipídico/g. de hígado}$ .

En el polo distal, después de un incremento apreciable a las 24 horas, los valores obtenidos a las 48 y 72 horas, se encontraban por debajo de los basales. (Tabla VIII, Gráfica 13).

En el polo de sección, por el contrario, se pudo apreciar una disminución de los valores controles a unos  $2/3$  aproximadamente, a las 24 horas; a las 48 y 72 horas, los niveles eran superponibles. (Tabla VIII, Gráfica 14).

## 2.- Fracción mitocondrial

Fosfatasa ácida lisosomal:- La actividad de esta enzima se ha expresado en  $\text{nmoles/minuto/mg./ml}$ .

En el polo distal, la actividad de la fosfatasa ácida experimentó a las 6 horas, una disminución de una tercera parte de su actividad aproximadamente, seguida de un mínimo incremento a las 24 horas, sin objetivarse variaciones significativas en las restantes determinaciones, si bien a los 14 días existe un mínimo incremento en relación a los valores correspondientes a los 7 días. (Tabla IX, Gráfica 15).

En el polo de sección, sin embargo, después de un incremento previo de la actividad a las 6 horas, se registró una disminución parecida a los niveles mínimos en el polo distal hasta las 48 horas; a partir de entonces se recuperaron e incluso superaron los niveles de actividad observados en los controles, tanto a los 7 como a los 14 días. (Tabla IX, Gráfica 16).

Proteínas mitocondriales:- Este parámetro se ha referido, al igual que sus homónimas microsomales, al tejido hepático: así pues, sus valores se han expresado en mg. de proteína mitocondrial/g. de hígado.

En el polo distal, existe una disminución progresiva de las proteínas contenidas en la fracción mitocondrial, que presentan su punto mínimo a los 14 días. (Tabla X, Gráfica 17).

En el polo de sección, se registra asimismo una disminución en conjunto, con ciertas oscilaciones. Destaca, por otra parte, el hecho de que la disminución de dichas proteínas era más acusada ya a las 6 horas que en el polo distal. El punto mínimo aconteció igualmente a los 14 días. (Tabla X, Gráfica 18).

215

A.E. Fosf. Ácida  
nmoles/min./mg./ml.

	Basal			6 h.	24 h.	48 h.	7 dias	14 dias
Exp.1	19'44	P. distal	Exp.1	11'4	11'62	11'64	11'2	11'5
Exp.2	14'81		Exp.2	11	12'76	12'68	11'5	11'7
$\bar{X}$	17'12		$\bar{X}$	11'2	12'19	12'16	11'35	11'6
		P. sección	Exp.1	18'73	14'77	10'73	20'2	19'1
			Exp.2	18'3	16'52	11'53	19'7	19'3
			$\bar{X}$	18'51	15'64	11'13	19'95	19'2

TABLA - IX

Prot. Mitoc. mg./g. hígado

	Basal			6 h.	24 h.	48 h.	7 dias	14 dias
Exp.1	22'15	P. distal	Exp.1	16'32	15'8	9'08	7'69	6'90
Exp.2	16'8		Exp.2	16'1	14'03	8'94	7'1	7'05
$\bar{X}$	19'47		$\bar{X}$	16'21	14'91	9'01	7'39	6'97
		P. de sección	Exp.1	12'07	12'2	9'84	12'53	7'27
			Exp.2	11'97	14'14	7'80	11'9	7'16
			$\bar{X}$	12'02	13'17	8'8	12'21	7'21

TABLA - X

E.F.A. mmol/min, mg/ml

20

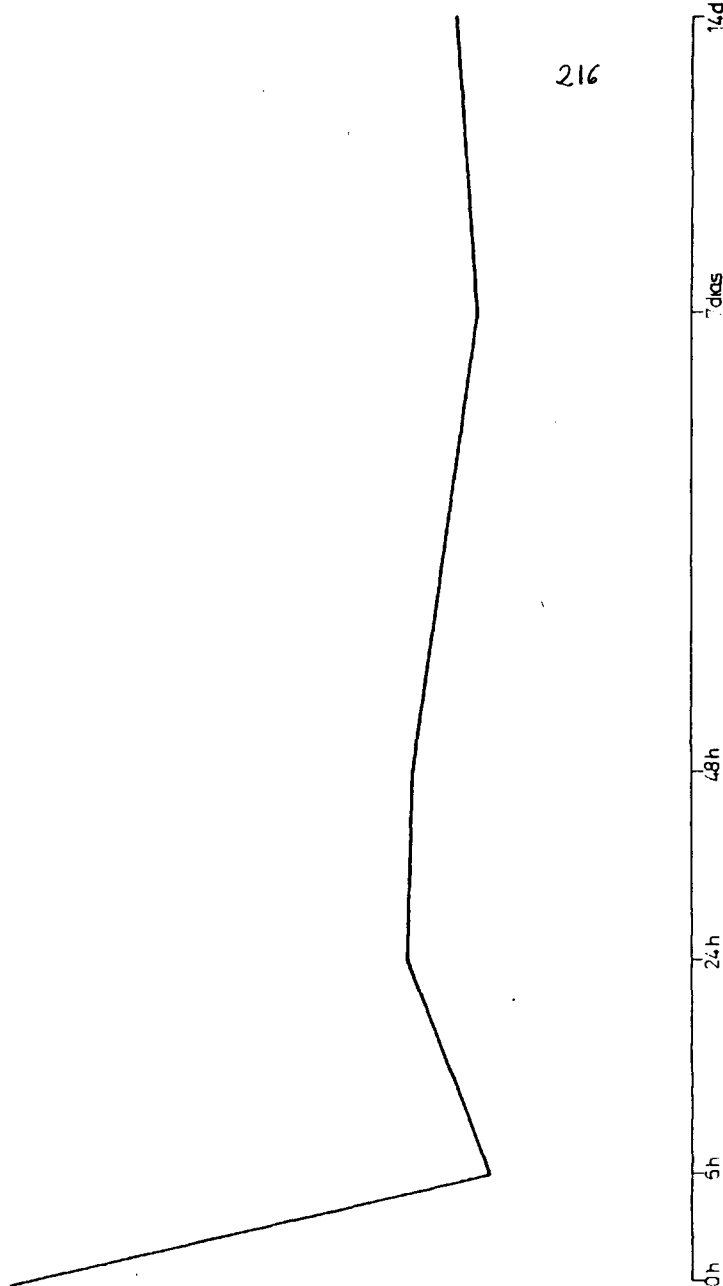
18

16

14

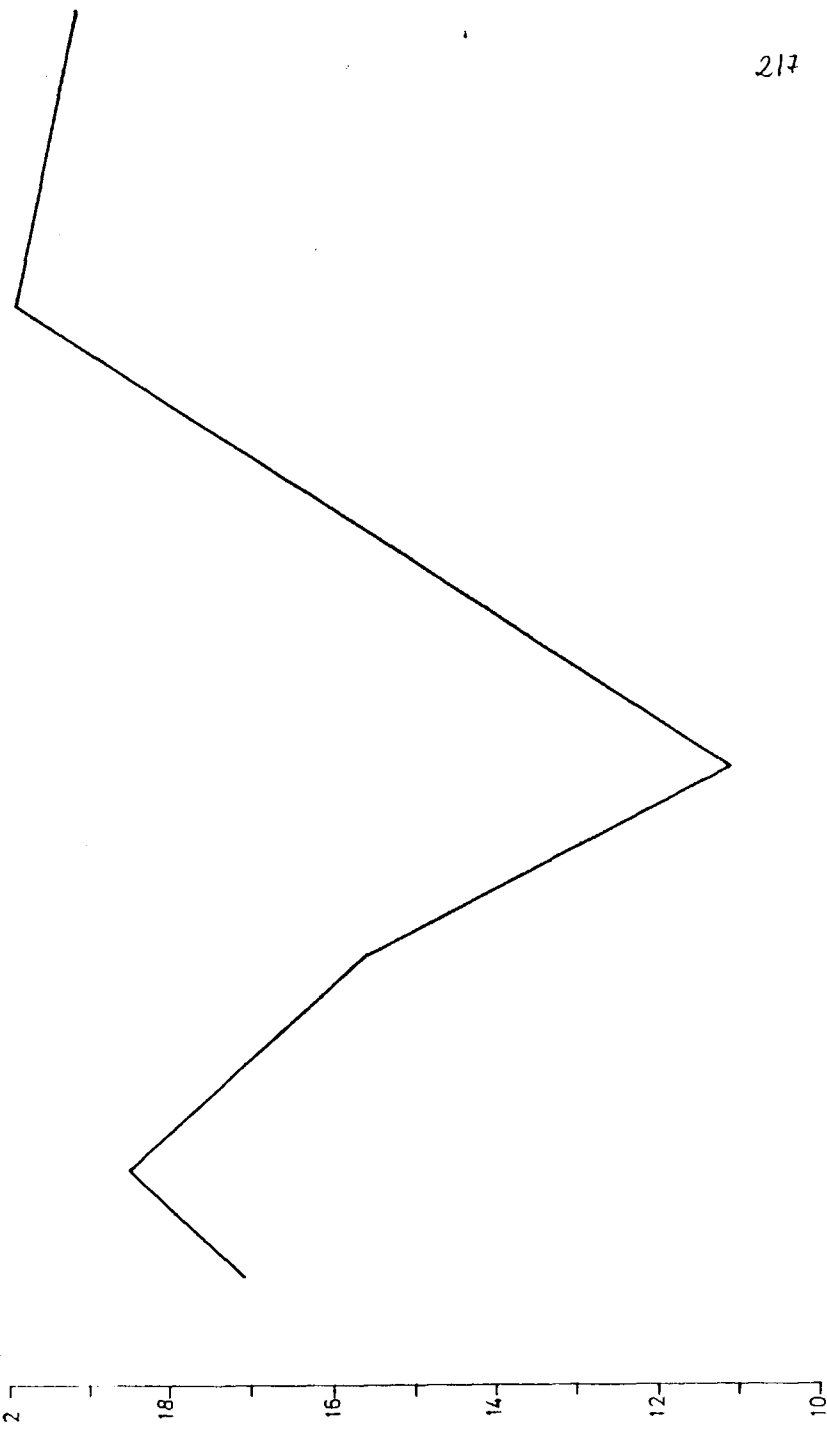
12

10

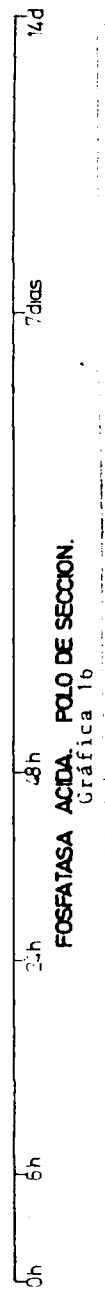


216

FOSFATASA ACIDA. POLO DISTAL.  
Gráfica 15



217

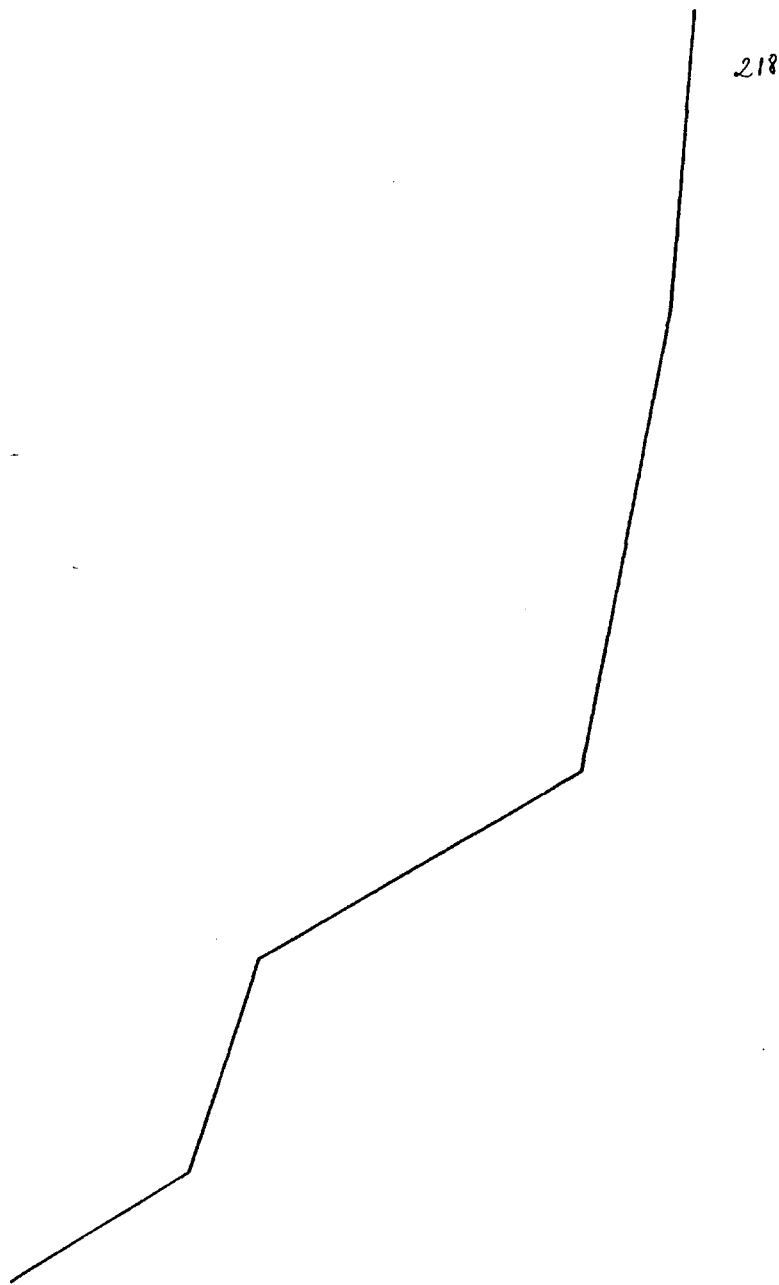


FOSFATASA ACIDA. POLO DE SECCION.  
Gráfica 10



Mitoc.mg/ I Hepat.

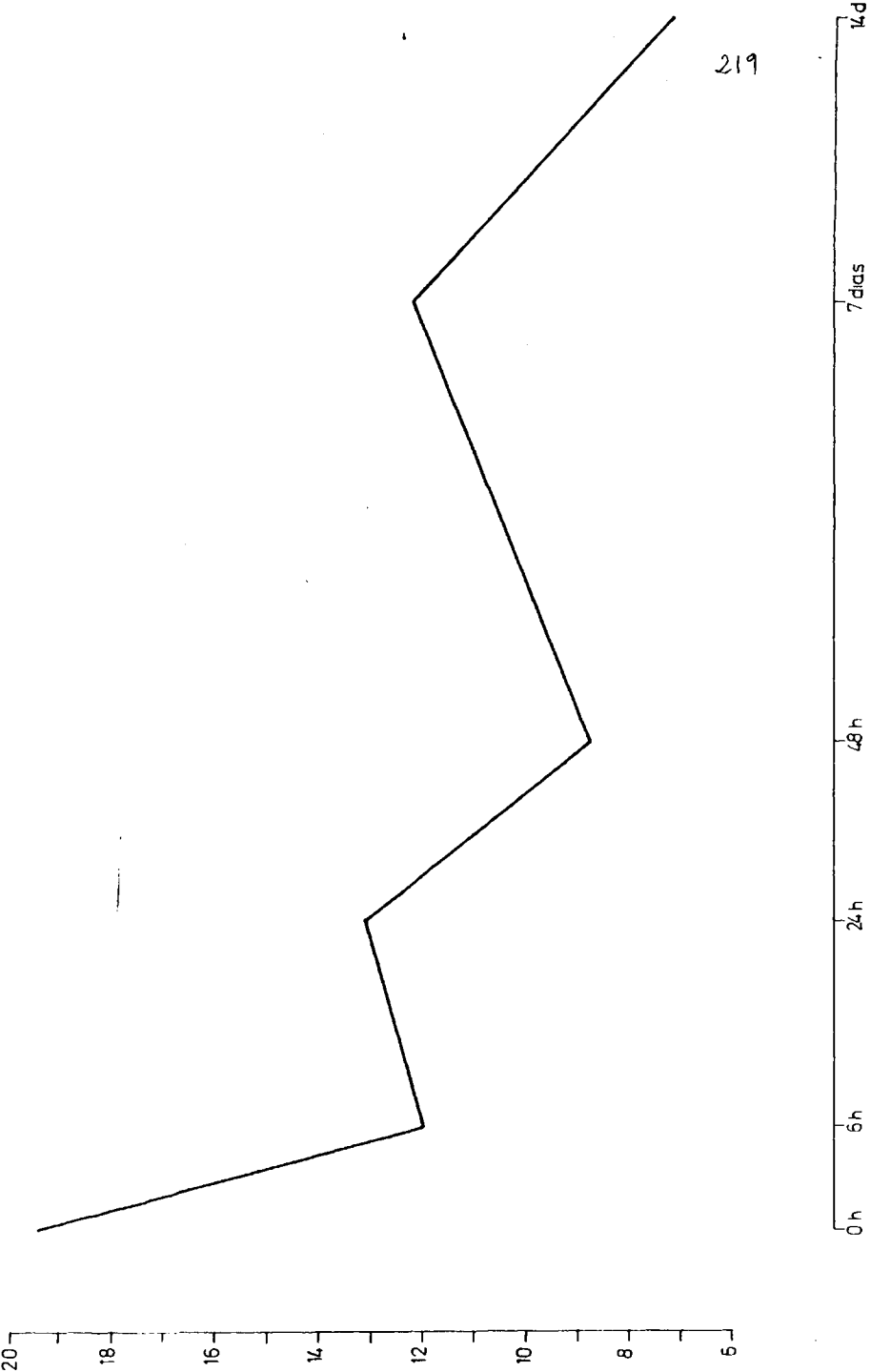
20  
18  
16  
14  
12  
10  
8  
6



0h 6h 24h 48h 7dias 14d

PROTEINAS MITOCONDRIALES. POLO DISTAL.

Gráfica 17



219

PROTEINAS MITOCONDRIALES. POLO DE SECCION.

Gráfica 18

#### VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Los niveles de glucagón, según se desprende de nuestros resultados, se encuentran ya elevados en sangre portal, una hora después de la resección hepática, alcanzando el punto máximo a las 6 y manteniéndose a las 24 horas; posteriormente se inicia un retorno a los valores basales que se alcanzan a las 72 horas. (Gráfica 3).

En sangre suprahepática, sin embargo, las oscilaciones son mucho menores, si bien suelen experimentar las variaciones descritas a nivel portal. (Gráfica 3).

Parece pues, que el páncreas aumenta sensiblemente la producción de glucagón, del mismo modo que el hígado incrementa paralelamente la utilización de dicha hormona en el período descrito, que corresponde fundamentalmente al período de hipertrofia celular, si bien en la fase correspondiente al período de hiperplasia celular se registran aún altos niveles de glucagón en sangre portal y, en menor grado, a nivel suprahepático.

En cuanto a la insulina, después de un ligero incremento en sangre portal y una disminución de parecida cuantía a nivel suprahepático, se registra un descenso en las concentraciones de dicha hormona a las 6 horas en sangre portal, persistiendo la disminución a nivel suprahepático (Gráfica 6).

Posteriormente, se aprecia un discreto incremento en sangre portal a las 24 y 48 horas, que no llega a las cifras basales, para acusar los niveles más bajos a las 72 horas, sin que a los 7 días se hayan recuperado los niveles obtenidos en los animales controles (Gráfica 6).

En sangre suprahepática, se aprecian desde las 24 horas niveles superponibles a los basales (Gráfica 6).

Parece pues que el páncreas, después de un ligero incremento en la producción de insulina en la primera hora postoperatoria, disminuye dicha producción a lo largo de todo el proceso.

El hígado, por su parte, parece experimentar, después de un discreto incremento del consumo de insulina, una disminución en la utilización de dicha hormona, que se traduce en una constancia de los niveles de insulina en sangre suprahepática, salvo en las primeras horas del postoperatorio.

Así pues, se ha podido objetivar que el glucagón sufre un incremento y la insulina una disminución en su producción pancreática, amortiguando el hígado en su mayor parte, por medio del índice de utilización de ambas hormonas, las grandes variaciones registradas a nivel portal, que no tienen un reflejo similar a nivel suprahepático.

En la fracción microsomal, las determinaciones del Citocromo  $P_{450}$ , ponen de manifiesto una disminución de éste a lo largo del proceso, tanto en el parénquima distal como en el polo de sección producto de la hepatectomía, si bien en el polo de sección, los niveles de Citocromo  $P_{450}$  son indetectables a los 7 y 14 días, y la disminución es, asimismo, mucho más acusada en las primeras fases del proceso.

En el polo distal, parece iniciarse una recuperación de las concentraciones de dicho citocromo a los 7 días, sin que a los 14 días se hayan aún normalizado.

Asimismo, destaca la parecida morfología en ambas curvas evolutivas, hecho que será analizado en nuestra discusión.

Este descenso en los niveles de  $P_{450}$  no se puede referir a una disminución de las proteínas microsomales, pues éstas exhiben por el contrario un incremento en las primeras fases y después de un notable descenso a las 48 horas, experimentan una recuperación total al final de nuestro estudio, en el polo distal.

Estos hechos no se objetivan en el polo de sección, donde permanecen por debajo de los niveles basales a lo largo del proceso.

De igual forma que las proteínas, los valores correspondientes a lípidos totales y fosfolípidos, exhiben un discreto incremento en el polo distal a las 24 horas de la intervención, presentando una disminución moderada a las 48 y 72 horas, tiempos en los que las proteínas se encontraban asimismo disminuídas respecto a los niveles basales.

En el polo de sección, por el contrario, la disminución a las 24 horas tanto de los niveles de lípidos totales como de fosfolípidos era ya muy acusada, persistiendo en las restantes determinaciones.

Así pues, durante el período de hipertrofia celular y síntesis de DNA se objetiva en el polo distal un incremento de los diversos componentes del retículo endoplásmico, tales como las proteínas, lípidos y fosfolípidos microsomales; acompañándose, no obstante, de una disminución de los niveles de  $P_{450}$ .

En el polo de sección, por el contrario, se aprecia una disminución notable y temprana de todos los factores analizados, que se mantienen a lo largo de todo el proceso.

En cuanto a las determinaciones efectuadas en la fracción mitocondrial, destaca en el polo distal la rápida disminución de la actividad de la fosfatasa ácida lisosomal, sin experimentar variaciones significantes a lo largo del proceso, no habiéndose restituido aún a los 14 días los niveles de actividad observados en los animales controles.

Por el contrario, en el polo de sección, se pudo apreciar una restitución e incluso un incremento en la actividad de dicha enzima respecto a los controles. Sin duda, la correlación morfológica aportaría quizá datos al respecto, que explicaran este fenómeno.

De otra parte, las proteínas contenidas en esta fracción, en oposición a las proteínas microsomales, no se restituyeron al final de nuestro estudio, exhibiendo además una rápida disminución, que fue más acusada, en las primeras fases, a nivel del polo de sección.

Posteriormente, se registraron ciertas oscilaciones en esta última zona del parénquima y, a los 14 días, los valores eran menores de la mitad que los obtenidos en los controles.

ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO OPTICO Y  
ULTRAMICROSCOPICO.



Dicho estudio fue realizado en los diferentes lotes de animales pertenecientes al grupo B, como se expuso anteriormente.

Desarrollaremos nuestra exposición, tanto en el estudio óptico como en el ultramicroscópico, refiriéndonos sucesivamente al parénquima distal y al polo de sección, producto de la hepatectomía. Asimismo, el análisis de ambas zonas de tejido será expuesto de acuerdo a su evolución dinámica a lo largo del proceso.

De acuerdo con este planteamiento, distinguiremos sucesivamente:

ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO OPTICO

- Controles (no sometidos a hepatectomía parcial-H.P.)
- Polo distal
  - 6 horas después de la H.P.
  - 24 horas después de la H.P.
  - 48 horas después de la H.P.
  - 72 horas después de la H.P.
  - 7 días después de la H.P.
- Polo de sección
  - 6 horas después de la H.P.
  - 24 horas después de la H.P.
  - 48 horas después de la H.P.
  - 72 horas después de la H.P.
  - 7 días después de la H.P.

ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO ULTRAMICROSCOPICO

Dicho estudio se efectuará del mismo modo que hemos expuesto, en relación a la microscopía óptica.

### ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO OPTICO

#### Controles

Los cortes estudiados exhibían una estructura normal y los hepatocitos presentaban las características habituales.

#### Polo distal

- 6 horas: La estructura está conservada; los hepatocitos aparecen disminuídos moderadamente de tamaño y ocasionalmente presentan dos núcleos. Por zonas, las células de Kupffer exhiben mayor tamaño que el habitual. En uno de los cortes, tan solo se pudo encontrar una figura de mitosis. Los espacios porta no presentan infiltración anormal y las venas centrales aparecen dilatadas y conteniendo hematíes, en su mayor parte.

En zonas periportales, existe degeneración globoide celular y, mediante la técnica de PAS, estos acúmulos ovoideos se tiñen intensamente. Su tamaño oscila entre 1-2'5 veces el de un hematíe y corresponden a autofagosomas (Fotos 1 y 2); asimismo, el PAS objetiva moderada cantidad de material PAS + en el citoplasma de los hepatocitos.

La técnica de Perls demuestra la ausencia de pigmento férrico y el patrón de reticulina no presenta alteraciones.

- 24 horas: A pequeño aumento, la estructura hepática lobulillar aparece conservada, con sinusoides de escasa luz y células de Kupffer prominentes. Los cordones de Remack presentan hepatocitos aumentados de tamaño, con citoplasma basófilo, llamando la atención la presencia de mitosis en diversos estadios, llegando ambos a producir una elongación de dichos cordones (Fotos 3 y 4). Índice mitótico: 11-12 mitosis/cm<sup>2</sup>.

Se observan también algunas células con dos o tres núcleos. Asimismo, se aprecia discreta desglucogenización, por zonas.

- 48 horas: La estructura hepática aparece conservada, si bien los cordones de Remack aparecen engrosados, tanto por aumento del tamaño celular como por la presencia de mitosis en diversos estadios. (Foto 5). Índice mitótico: 40 mitosis/cm<sup>2</sup>. No existe una distribución periportal o mediozonal de estas figuras de mitosis.

Los hepatocitos presentan un citoplasma con gránulos eosinófilos, finamente disgregados.

Se aprecian algunas células multinucleadas (Foto 6) y, generalmente, los nucleolos aparecen prominentes (Fotos 5 y 6).

Las células de Kupffer son escasamente notables. Con la técnica de PAS, algunas células presentan gránulos PAS positivos y otras, más escasos, debido al aumento del tamaño celular y consiguiente clarificación del citoplasma.

La técnica de Sudán pone de manifiesto la presencia de grasa, fundamentalmente, en zonas periporales. (Foto 7).

- 72 horas: La estructura aparece conservada, destacando un aumento manifiesto de las células de Kupffer. Los hepatocitos se encuentran aumentados de tamaño, observándose algunas mitosis (Foto 8). Índice mitótico: 4-5 mitosis/cm<sup>2</sup>.

Es frecuente la observación de nucleolos manifiestos, así como células binucleadas (Fotos 9,10 y 11); también se aprecian elementos con dos y hasta tres núcleos, de mayor tamaño (Fotos 9 y 12). Estas células son muy frecuentes por campo y poseen glucógeno en su citoplasma, como se comprueba con la técnica de PAS (Foto 12). Con la técnica de PAS-amilasa, desaparece la tinción.

Los espacios porta presentan sus características normales y el patrón de reticulina está conservado. La técnica de Sudán pone de manifiesto la presencia de grasa, fundamentalmente en situación periportal.

- 7 días: La estructura aparece conservada. Los hepatocitos presentan, generalmente, un citoplasma finamente granulado, con moderado aumento de su diámetro. En algunas zonas, los hepatocitos presentan un mayor diámetro, con degeneración vacuolar, que recuerda el aspecto de las células vegetales (Foto 13).

Los espacios porta y la vena central se encuentran dentro de los límites normales.

Existen gránulos PAS positivos en el citoplasma, que mantienen su apetencia tintorial por el PAS, con la técnica de PAS-amilasa.

Patrón de reticulina normal. La técnica de Perls demuestra la ausencia de pigmento férrico.

#### Polo de sección

- 6 horas: La estructura está conservada, aunque los sinusoides presentan dilatación intensa, encontrándose éstos repletos de hematíes.

El polo de sección está revestido por fragmentos de fibrina y polimorfonucleares neutrófilos, hematíes e histiocitos; se observan zonas de hemorragia y el parénquima subyacente presenta necrosis celular, edema y degeneración vacuolar (Foto 14).

La técnica de PAS, pone de manifiesto una intensa desglucogenización y, mediante la técnica de Sudán,

se aprecia que algunos hepatocitos presentan vacuolas lipídicas de mediano tamaño. El patrón de reticulina es normal.

- 24 horas: A nivel del polo de sección, se observa la existencia de fibrina y polimorfonucleares neutrófilos, en parte, en vías de necrosis.

El parénquima subyacente aparece pálido, con el citoplasma clarificado y el núcleo picnótico, siendo las zonas de necrosis, más acusadas a nivel centrolobulillar que en las periportales, en las que permanece un manguito de células conservadas; dichos manguitos son más abundantes cerca del área donde el hígado comienza a exhibir una estructura no necrosada (Foto 15). La separación entre las zonas necrosada y no necrosada, está perfectamente delimitada, observándose infiltración de polimorfonucleares neutrófilos a dicho nivel (Foto 16).

Se observan asimismo, cuerpos eosinófilos redondeados, que corresponden a autofagosomas, si bien su frecuencia era menor que en el parénquima distal (Foto 17).

Las células de Kupffer no presentan una reacción manifiesta. Existe desglucogenización muy marcada y, en las zonas de necrosis, las fibras de reticulina se encuentran en vías de desaparición.

- 48 horas: En la zona de necrosis, se aprecia una intensa infiltración de polimorfonucleares neutrófilos, que se disponen en banda a nivel de la zona que se continúa con el parénquima hepático, el cual muestra unas células moderadamente hipertróficas, con citoplasma escasamente denso y nucleolos ( a veces dos ) extraordinariamente grandes. Se observan frecuentes células binucleadas (Foto 18). En los cortes efectuados, solamente se ha podido hallar una figura de mitosis.  
Las células de Kupffer son escasamente prominentes y, mediante la técnica de PAS, se objetiva una marcada desglucogenización.
- 72 horas: Se aprecia una necrosis en banda, de 1 cm. de profundidad aproximadamente, con algunos regueros de polimorfonucleares neutrófilos. Se observa cariólisis celular y, alrededor de algunos espacios porta, existe una pequeña banda de una o dos células hepáticas conservadas.  
En las áreas de infarto, se aprecian zonas de hemorragia y los sinusoides aparecen muy dilatados.  
Las tres o cuatro hileras de células inmediatamente adyacentes a la zona de necrosis, presentan degeneración vacuolar en algunas células y nucleolos extraordinariamente prominentes. En esta zona se ha observado la presencia de alguna mitosis aislada (Foto 19).



En áreas más alejadas, los hepatocitos muestran un moderado aumento de tamaño y desglucogenización, exhibiendo las células de Kupffer sus características habituales.

- 7 días: Los hepatocitos presentan un aumento de tamaño y, frecuentemente, hinchamiento citoplásmico, que llega incluso a la necrosis y el PAS objetiva escasos gránulos PAS positivos en el citoplasma.

Las células de Kupffer son muy prominentes.

Asimismo, se aprecia la existencia de tejido conectivo joven, con numerosos vasos sanguíneos, vasos de gruesa pared y endotelio prominente, así como infiltración de linfocitos, polimorfonucleares y eosinófilos, además de frecuentes histiocitos, algunos de ellos con dos núcleos (Fotos 20 y 21).

#### ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO ULTRAMICROSCOPICO

##### Controles

Se observó reiteradamente normalidad celular, tanto en el núcleo, como en los diferentes orgánulos citoplásmicos (Fotos 22 y 23).

##### Polo distal

- 6 horas: Por áreas, el citoplasma de los hepatocitos presenta un retículo endoplásmico prominente, a expensas, fundamentalmente del R.E. liso que aparece dilatado. Se observa además, gotas lipídicas de tamaño moderado y frecuentes cuerpos lamelares (Fotos 24 y 25).

- 24 horas: Los hepatocitos aparecen hipertróficos debido, tanto a un aumento del contenido acuoso (Foto 26), como a un incremento del R.E. rugoso (Foto 27) y acúmulos lipoides (Foto 26).

Se aprecian asimismo, pequeños cuerpos que corresponden a autofagosomas, los cuales contienen en su interior diversos orgánulos citoplásmicos, en mayor o menor grado de destrucción (Foto 28).

Es muy llamativa la presencia de más de un nucleolo de gran tamaño en algunas células hepáticas (Foto 26).

- 48 horas: Se observan vacuolas de lipoides abundantes (Foto 29). Frecuentemente se aprecia tumefacción mitocondrial y cristolisis (Foto 30). El R.E. rugoso es abundante y los canales biliares presentan una morfología normal (Foto 31).

- 72 horas: Los hepatocitos presentan tumefacción citoplásmica y acúmulo de lípidos así como hipertrofia y dilatación del R.E. liso; el R.E. rugoso es escaso (Foto 32).

Se aprecian además, elementos revestidos por una o dos membranas, que parecen corresponder a autofagosomas, en grado avanzado de evolución, los primeros; y los segundos, a mitocondrias hinchadas y tumefactas, con matriz disminuida (Foto 33).

- 7 días: Se aprecian hepatocitos tumefactos, cuyo citoplasma presenta gran cantidad de mitocondrias con una matriz clara y desorganización de las crestas, encontrándose éstas, rechazadas hacia la periferia. Estas células corresponden a las observadas en microscopía óptica, de aspecto granular o vegetal (Foto 34).

Por zonas, el R.E. liso se encuentra muy dilatado y es más manifiesto que el R.E. rugoso (Foto 35)

Polo de sección

- 6 horas: Se observa tumefacción turbia y frecuentes vacuolas lipoides (degeneración grasa), así como edema, por zonas, en el citoplasma y tumefacción mitocondrial (Fotos 36 y 37); se aprecia asimismo, la existencia de autofagosomas y algunos cuerpos lamelares (Foto 37).

Se observa además una probable célula CALP, exhibiendo un típico acúmulo lipóide en su citoplasma, que, al igual que las restantes observadas, no parece exhibir variaciones dignas de mención (Foto 36).

- 24 horas: Se aprecian zonas de necrosis, alternando con otras en las que, los hepatocitos están bien conservados (Foto 38). También se han podido objetivar grandes cuerpos lamelares (Foto 39).

- 48 horas, 72 horas y 7 días: Se observan zonas de necrosis, con gran cantidad de polimorfonucleares, hematíes y detritus celulares (Foto 40), y otras en las que, los hepatocitos presentan zonas hiperclaras, con separación de los orgánulos nucleares (Foto 41).

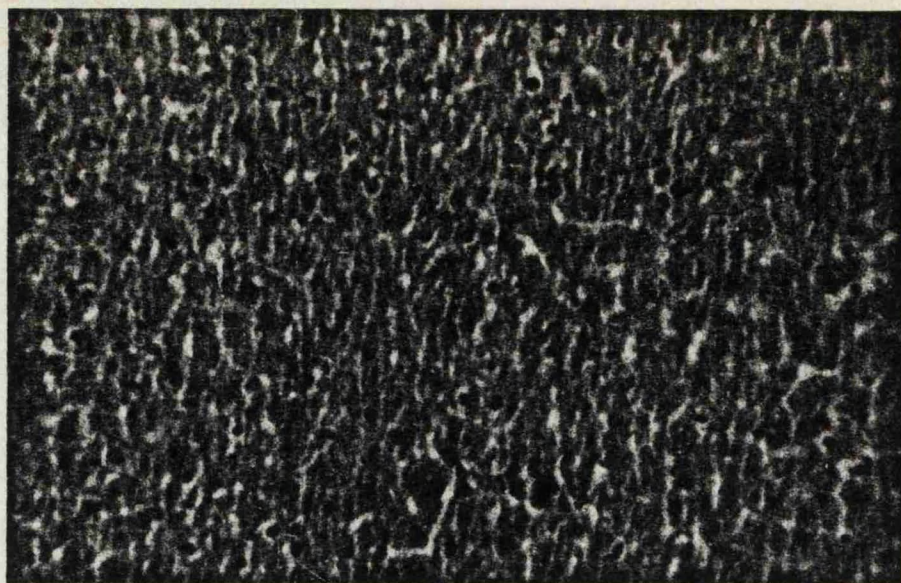


Foto 1.- Desglucogenización del parénquima hepático. Obsérvense los frecuentes autofagosomas, intensamente teñidos con esta técnica, que presentan muchos hepatocitos (Polo distal-6 horas).PAS, 125 x. a.d.

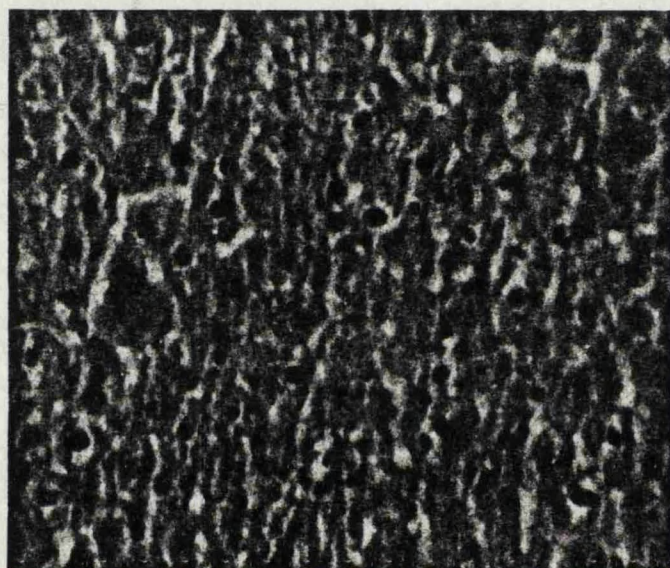


Foto 2.- A mayor aumento, se pueden observar imágenes análogas a las descritas en la figura anterior. (Polo distal-6 horas) PAS 200 x. a.d.



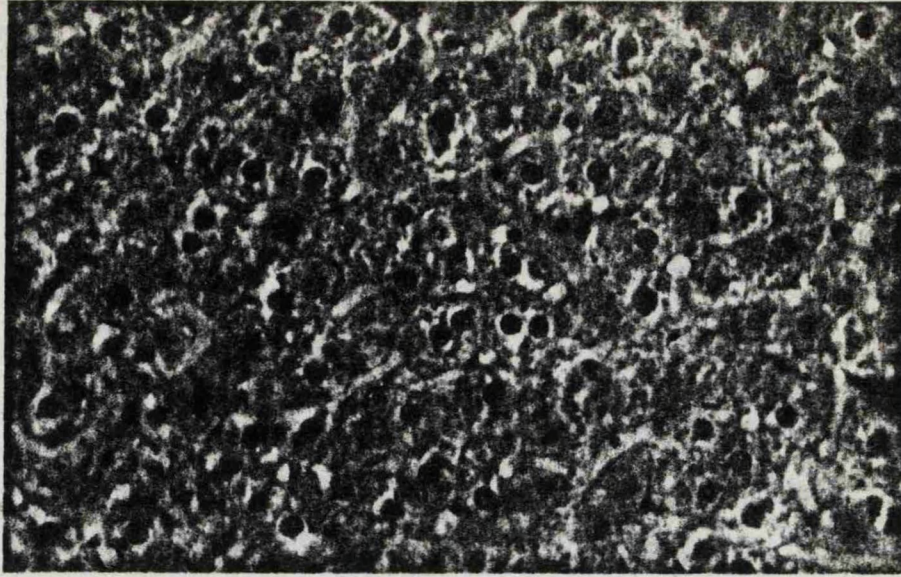


Foto 3.- Hepatocitos aumentados de tamaño, con citoplasma granular. Es frecuente observar figuras de mitosis, o bien, imágenes como la presente, en que la división mitótica está finalizando, produciendo un crecimiento en longitud, de los cordones hepáticos. (Polo distal-24 horas).H.E. 200 x.

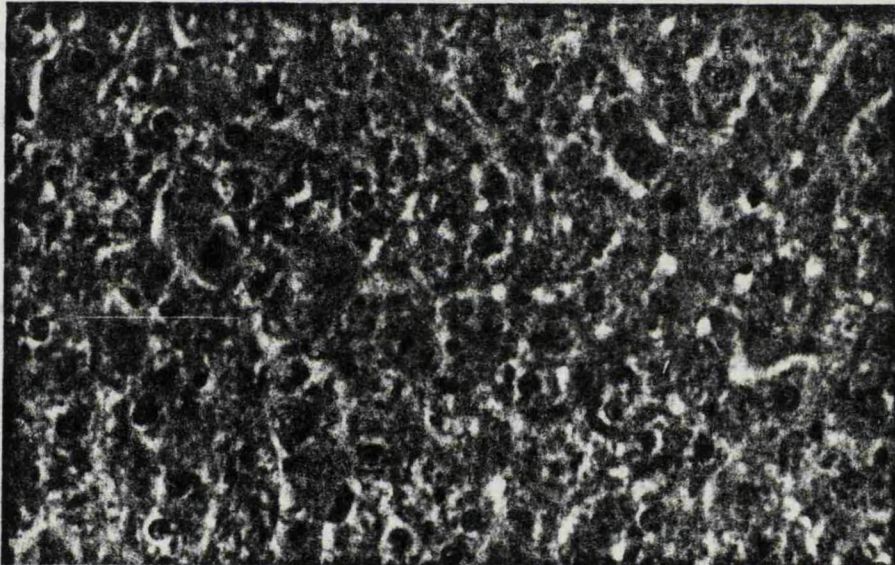


Foto 4.- Se observa una figura de mitosis y el crecimiento cordonal postmitótico, referido en la figura anterior. (Polo distal- 24 horas). H.E. 200 x. a.d.



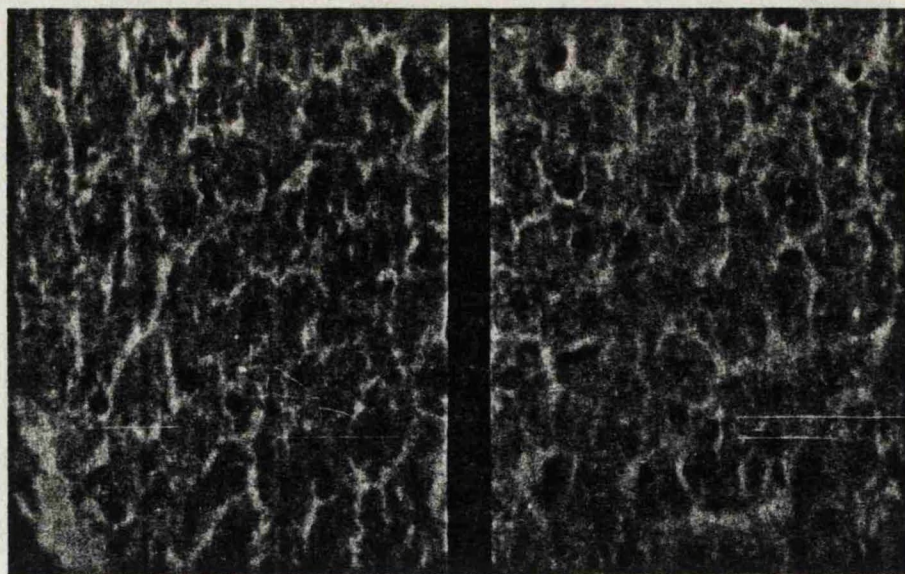


Foto 5.- Se observan figuras de mitosis y nucleolos prominentes en las células hepáticas (Polo distal-48 horas).H.E. 200 x. a.d.

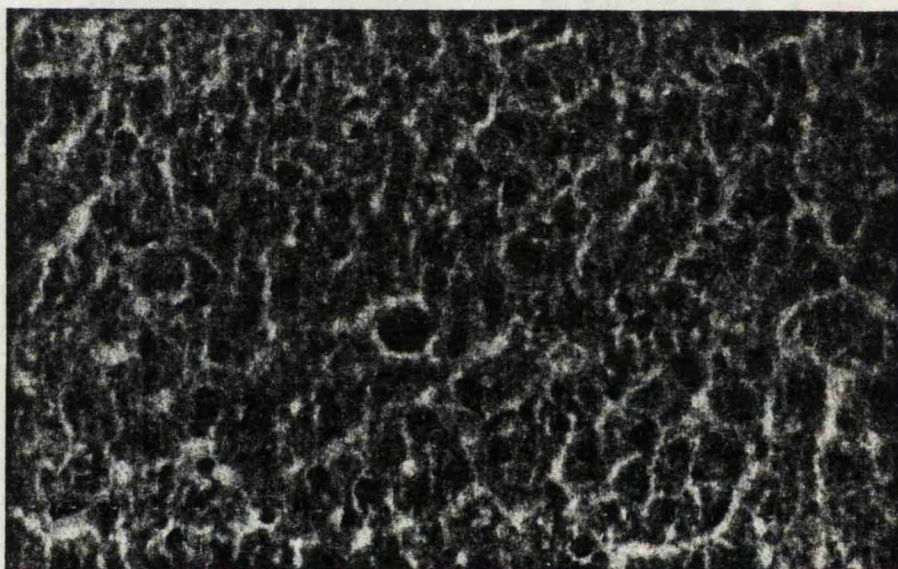


Foto 6.- Obsérvese en el centro, una célula multinucleada y nucleolos prominentes en otros hepatocitos. En este grupo, se encontró con relativa frecuencia este hallazgo. (Polo distal-48 horas) H.E. 200 x. a.d.



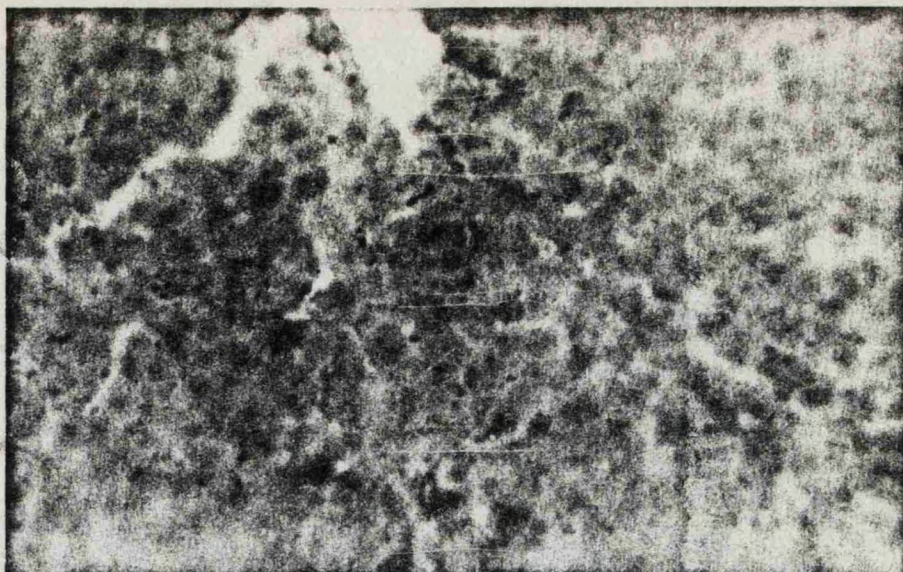


Foto 7.- En zonas centrolobulillares, los hepatocitos presentan frecuentes gotitas de lípidos en su citoplasma. (Polo distal-48 horas). Sudán Rojo. Corte de 15  $\mu$ . Técnica por congelación. 125 x a.d.

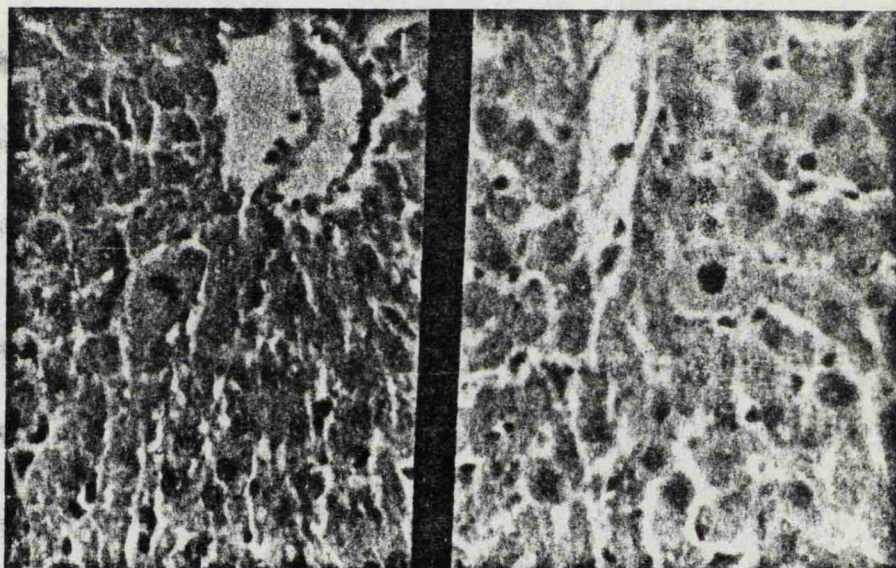


Foto 8.- En dos zonas centrolobulillares, se observan dos hepatocitos en mitosis, asimismo, se aprecian nucleolos manifiestos y alguna célula binucleada en la imagen derecha. (Polo distal-72 horas). H.E. 200 x. a.d.



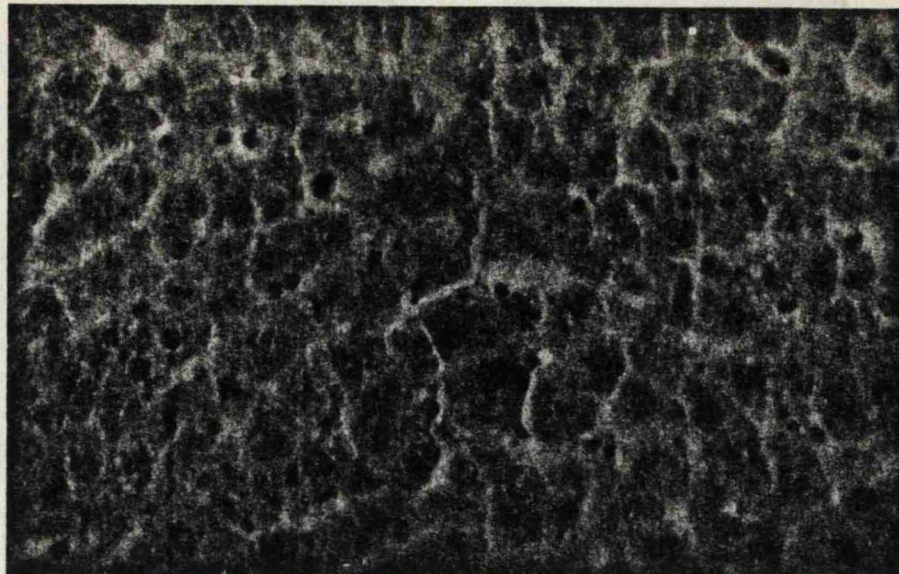


Foto 9.- Se observa una pareja de células binucleadas en la zona central, con nucleolos prominentes (Polo distal-72 horas).H.E. 200 x.a.d.

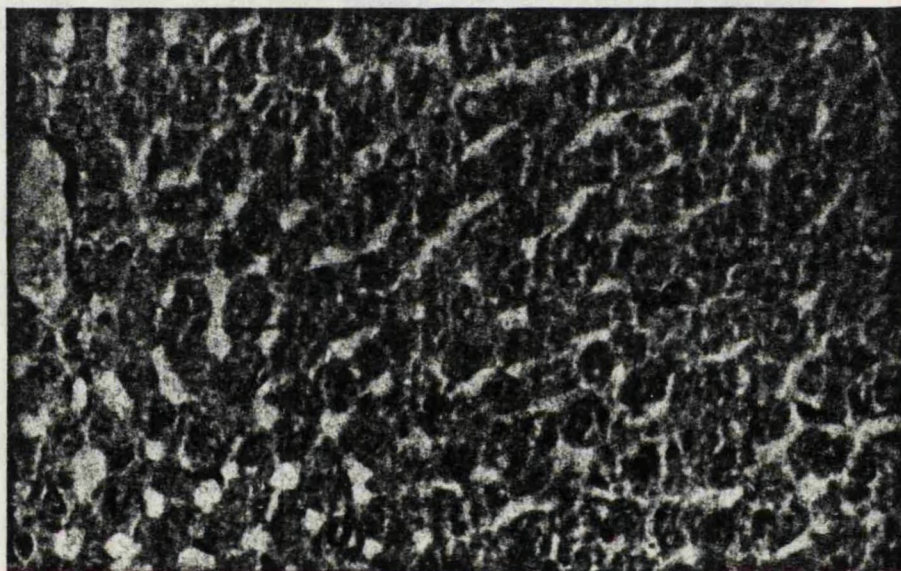


Foto 10.- Dilatación de los sinusoides en zona centrolobulillar. Se observa algún hepatocito binucleado (Polo distal-72 horas). H.E. 125 x.a.d.



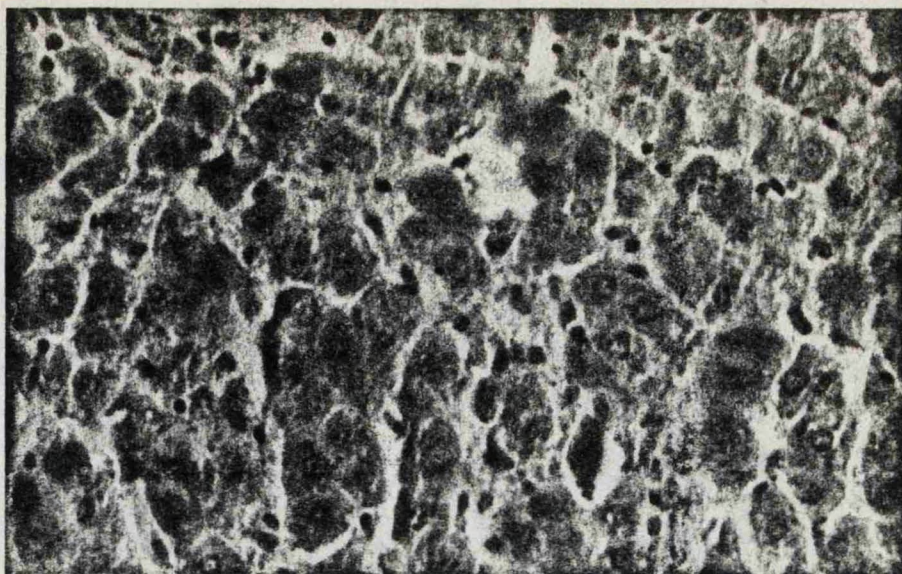


Foto 11.- Los hepatocitos muestran un citoplasma vacuolado. Asimismo, en la parte superior, se observan algunos hepatocitos binucleados (Polo distal-72 horas). H.E. 200 x.a.d.

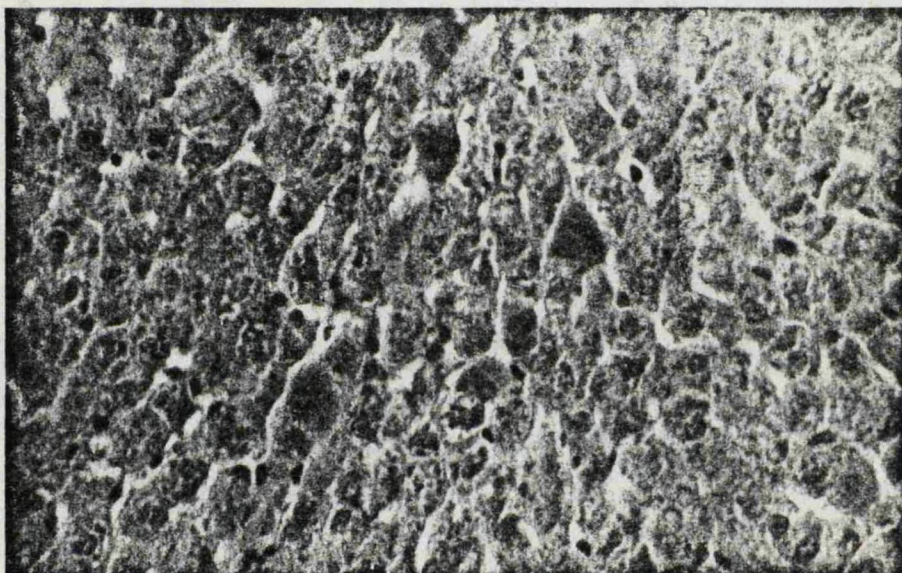


Foto 12.- Con la técnica de PAS, se observa una desglucogenización generalizada moderada, manteniéndose la apetencia tintorial solamente en algunas células, que son asimismo binucleadas. Con la técnica de PAS-amilasa desaparece la tinción (Polo distal-72 horas). PAS 200 x. a.d.



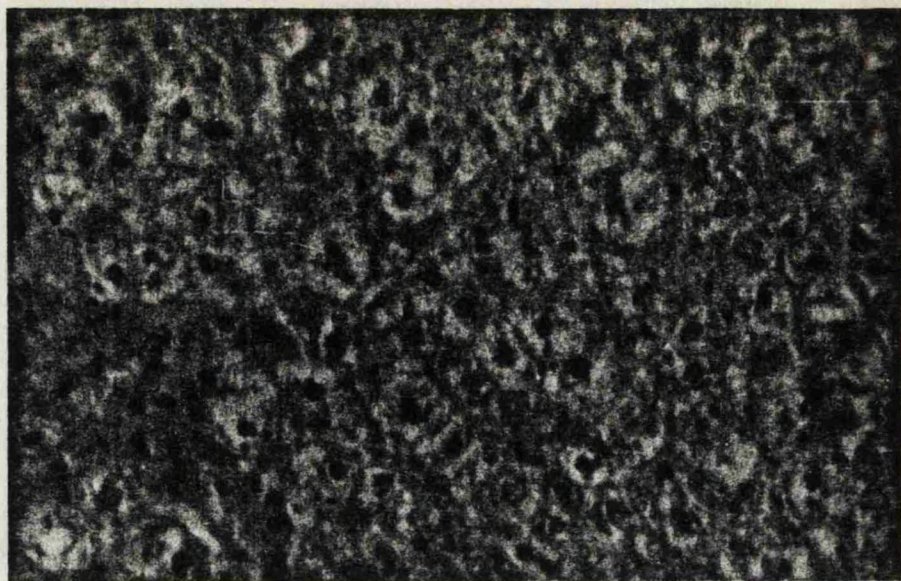


Foto 13.- Aumento de tamaño de los hepatocitos con degeneración vacuolar citoplásmica que da lugar a un aspecto que recuerda las células vegetales (Polo distal-7 días). H.E. 200 x. a.d.



Foto 14.- Se observa fibrina, entre células necrosadas e infiltración de polimorfonucleares neutrófilos con zonas de hemorragia. El parénquima hepático, presenta edema y degeneración vacuolar. (Polo de sección-6 horas). H.E. 125 x. a.d.



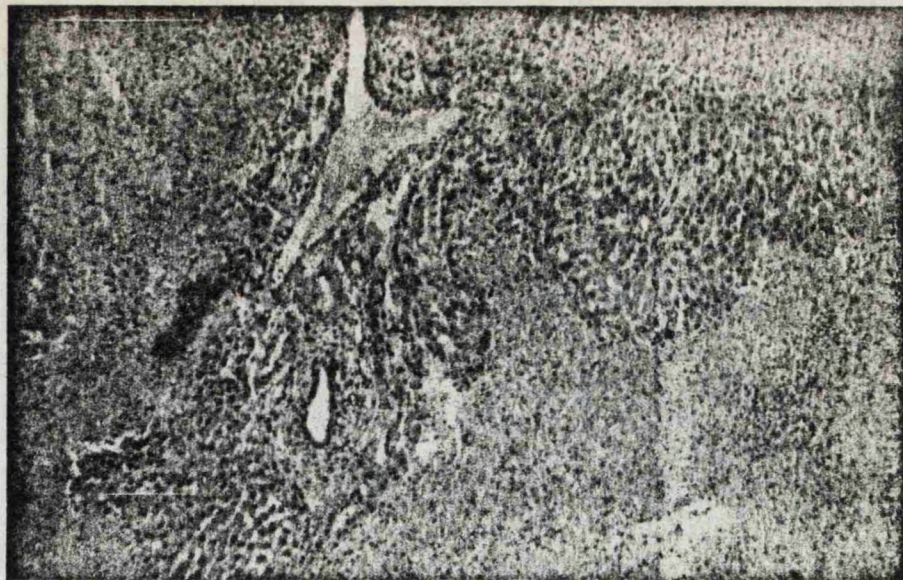


Foto 15.- Necrosis del parénquima hepático; conservación de zonas parénquimatosas periportales. (Polo de sección-24 horas). H.E. 50 x. a.d.

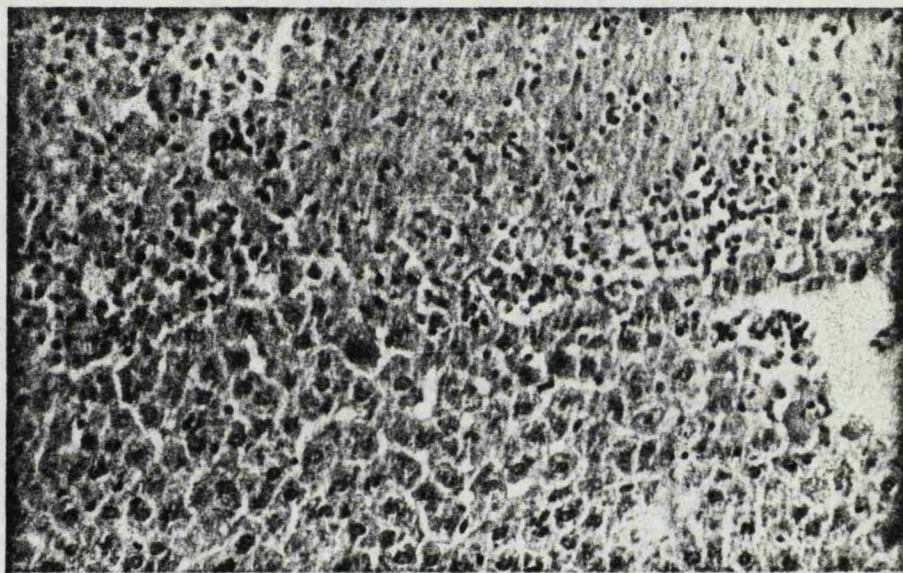


Foto 16.- A mayor aumento, en la parte superior de la imagen, se encuentra material necrosado con infiltración de polimorfonucleares neutrófilos, más abundantes en la zona adyacente al parénquima hepático conservado. (Polo de sección-24 horas). H.E. 125 x. a.d.



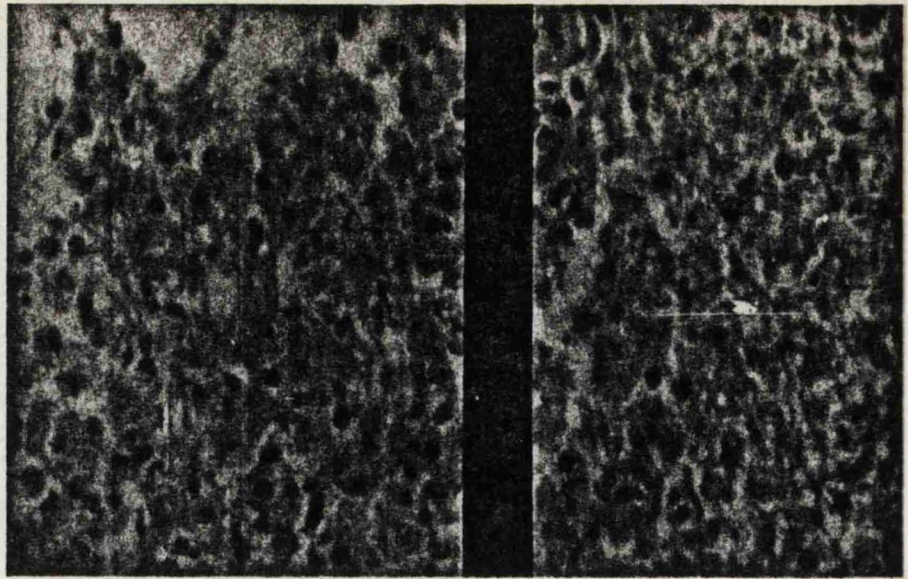


Foto 17.- Se observan cuerpos eosinófilos redondeados que llegan a ocupar todo el citoplasma, rechazando el núcleo (autofagosomas). Estos se observaron con mayor frecuencia en las zonas hepáticas distales. (Polo de sección-24 horas). H.E. 125 x. a.d.

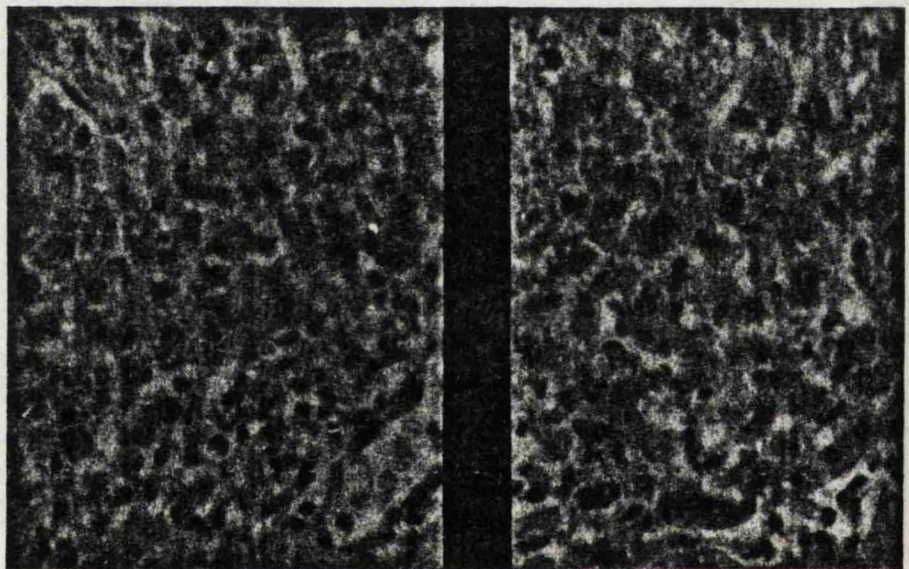


Foto 18.- Adyacentes al polo de sección (en parte superior y central de ambas imágenes), pueden observarse nucleolos hipertróficos y células binucleadas. (Polo de sección-48 horas). H.E. 200 x. a.d.



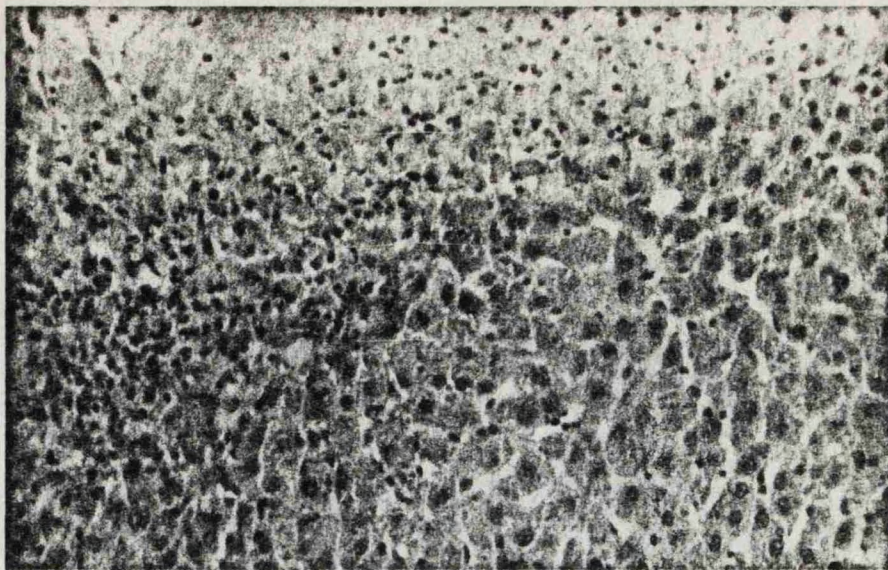


Foto 19.- Se observa la zona de necrosis en la parte superior izquierda de la fotografía. Inmediatamente adyacente, se aprecia una célula hepática en mitosis (este hallazgo era extraordinariamente raro). (Polo de sección-72 horas). H.E. 125 x. a.d.

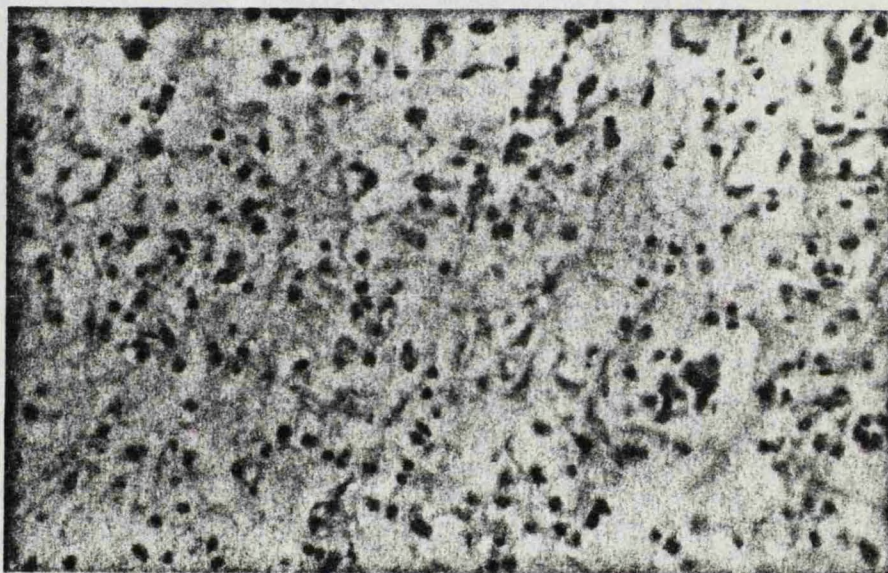


Foto 20.- En el polo de sección, la zona cicatricial se está organizando y, además de polimorfonucleares neutrófilos, se observan vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos e histiocitos, algunos de estos últimos (zona inferior derecha), con dos núcleos. (Polo de sección-7 días). H.E. 125 x. a.d.



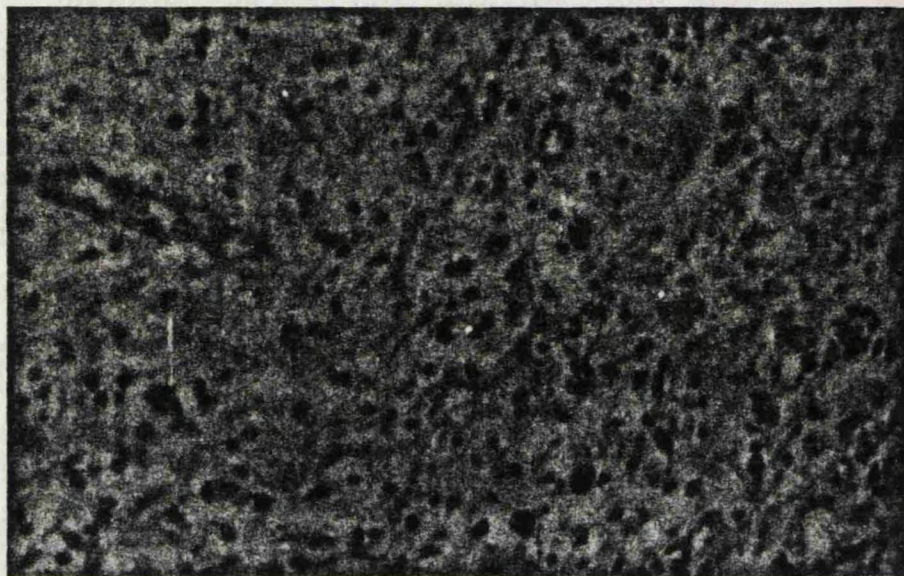


Foto 21.- Análogos comentarios a la imagen anterior,  
a mayor aumento. (Polo de sección-7 días).  
H.E. 200 x. a.d.





Foto 22.- Hepatocitos de características normales.  
(Grupo control). 7.200 x. a.f.





Foto 23.- Núcleo y orgánulos citoplásmicos de características normales (Grupo control). 19.400 x. a.f.

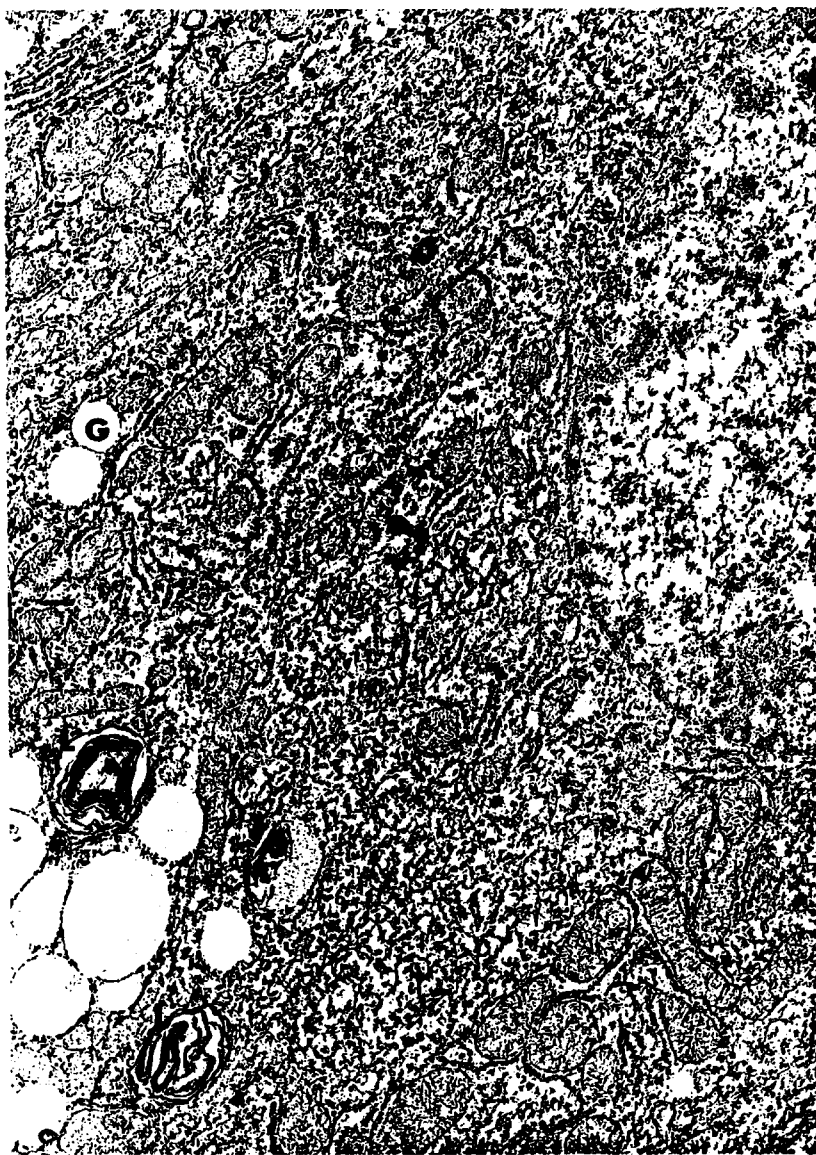


Foto 24.- R.E. prominente (fundamentalmente a expensas del R.E. liso); algunas gotas lipídicas (G) y cuerpos lamelares (L). (Polo distal-6 horas). 16.800 x. a.f.



Foto 25.- R.E. liso hipertrófico y dilatado (R.E.);  
gotas lipídicas (G) y cuerpos lamelares (L).  
(Polo distal-6 horas). 36.000 x. a.f.

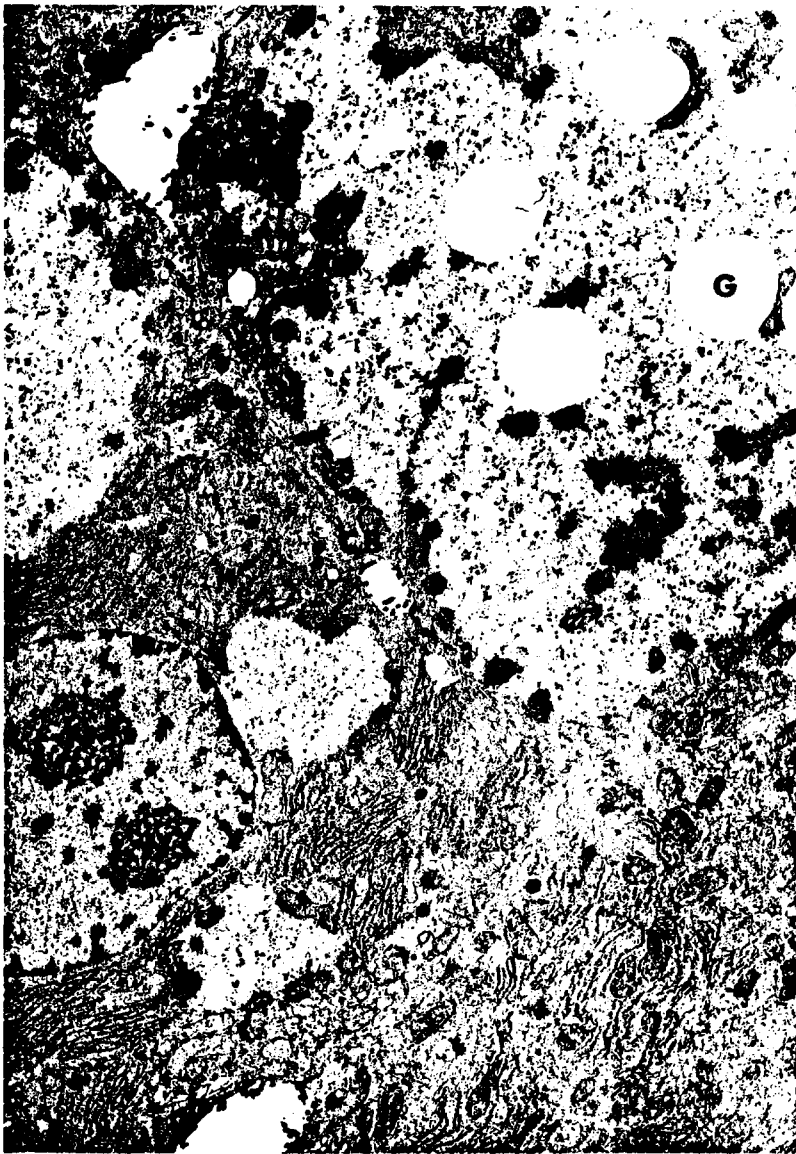


Foto 26.- Aumento del contenido acuoso intracelular; incremento del R.E. rugoso; acúmulos lipoides (G); el núcleo del hepatocito presenta dos nucleolos (N); canal biliar de características normales (C.B.). (Polo distal-24 horas). 9.000 x a.f.

254



Foto 27.- Incremento del R.E. rugoso (Polo distal-24 horas), 57.600 x. a.f.

255



Foto 28.- Autofagosoma , conteniendo restos mitocondriales y de membranas del R.E. (Polo distal-24 horas).  
63.000 x. a.f.

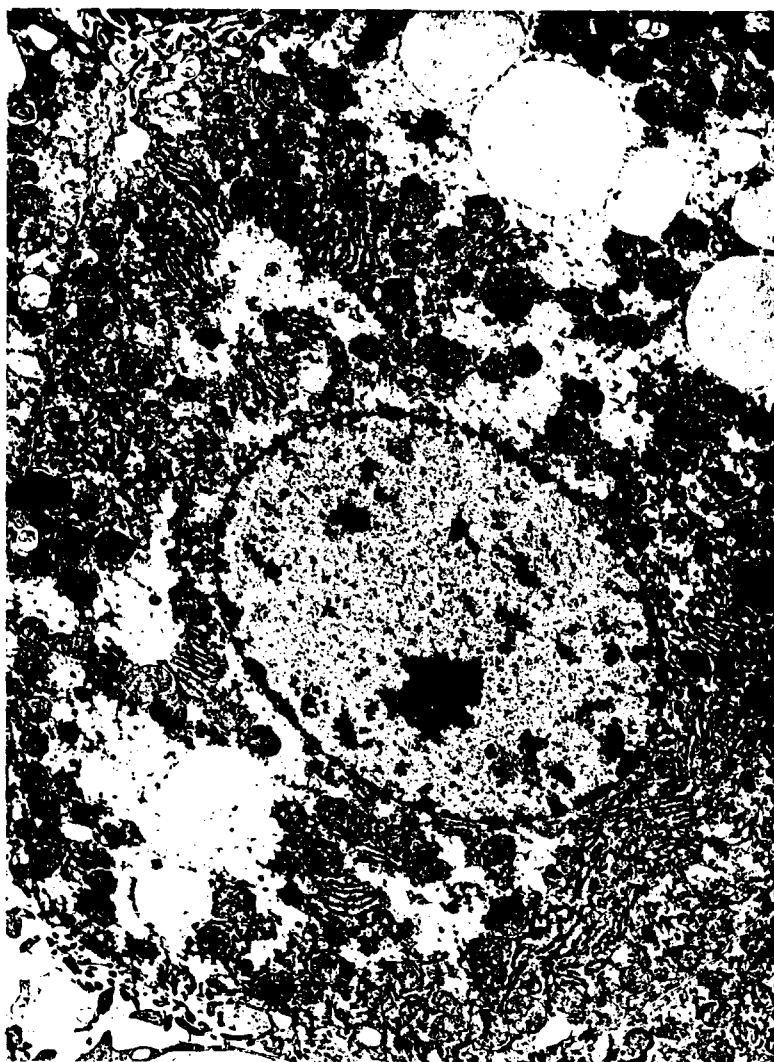


Foto 29.- Vacuolas lipoides y núcleo de características habituales (Polo distal-48 horas). 8.160 x. a.f.

256

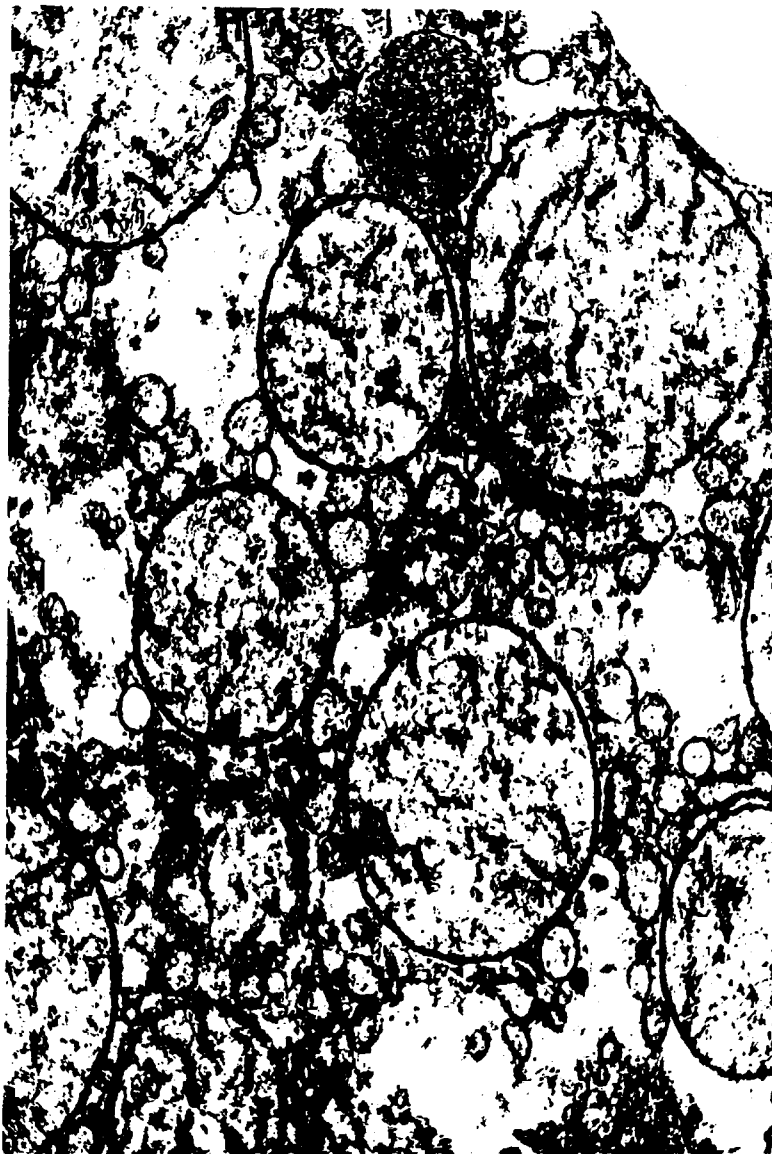


Foto 30.- Tumefacción mitocondrial y cristolisis (Polo distal-48 horas). 63.000 x. a.f.





Foto 31.- R.E. rugoso abundante; canal biliar de características normales (Polo distal-48 horas).  
19.800 x. a.f.

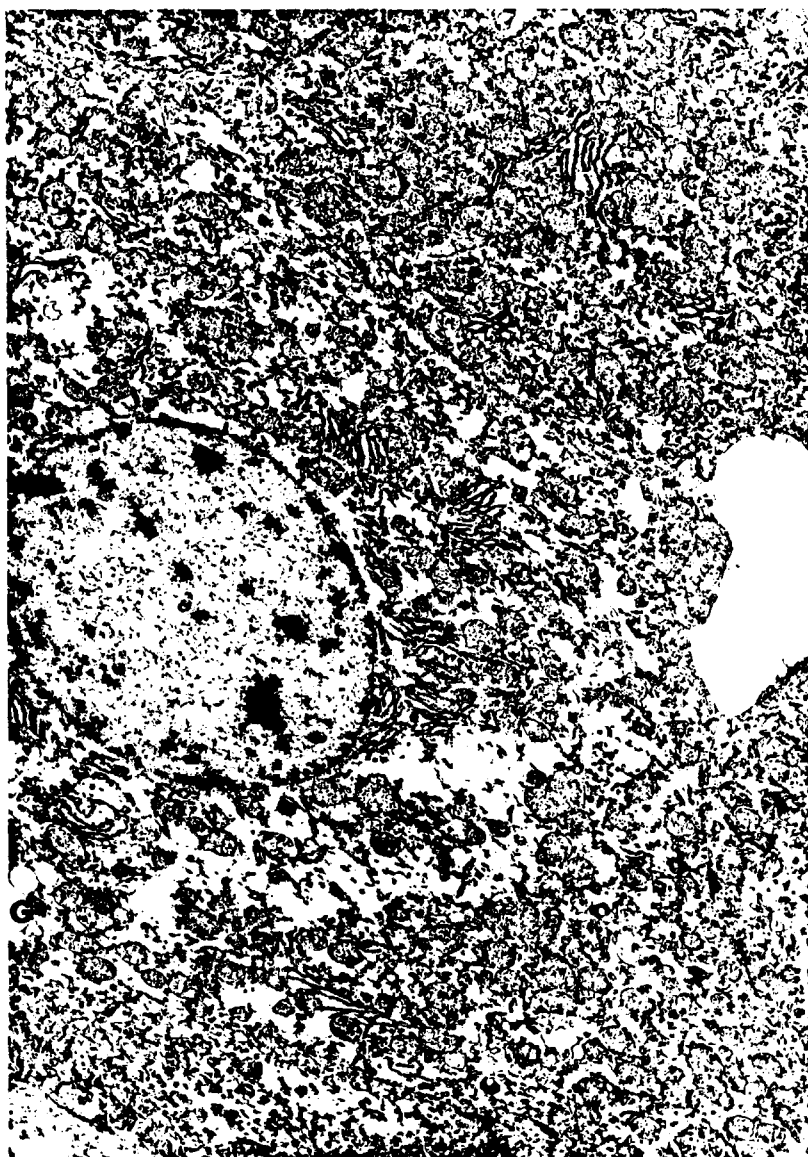


Foto 32.- Tumefacción citoplásmica; vacuolas lipoides (G); hipertrofia y dilatación del R.E. liso; R.E. rugoso escaso; núcleo de cromatina finamente distribuida (Polo distal-72 horas). 6.870 x. a.f.

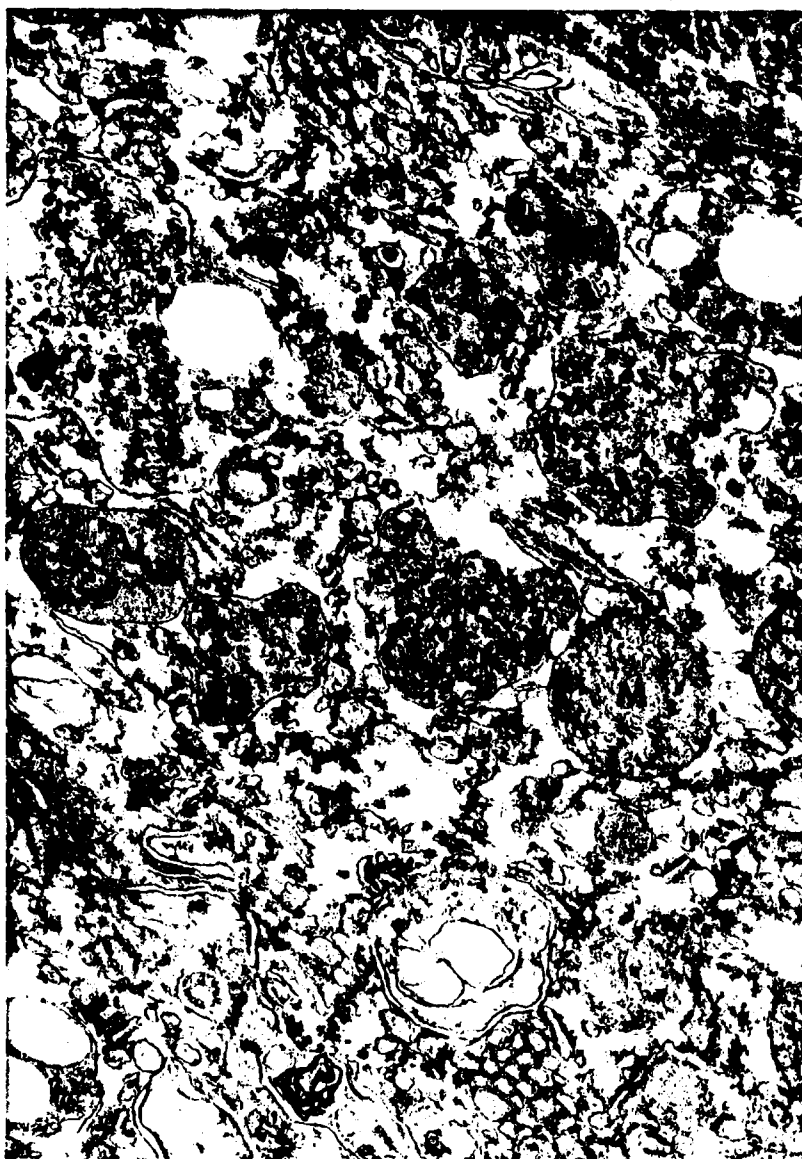


Foto 33.- Tumefacción mitocondrial (M); autofagosomas (A). (Polo distal-72 horas). 42.000 x. e.f.

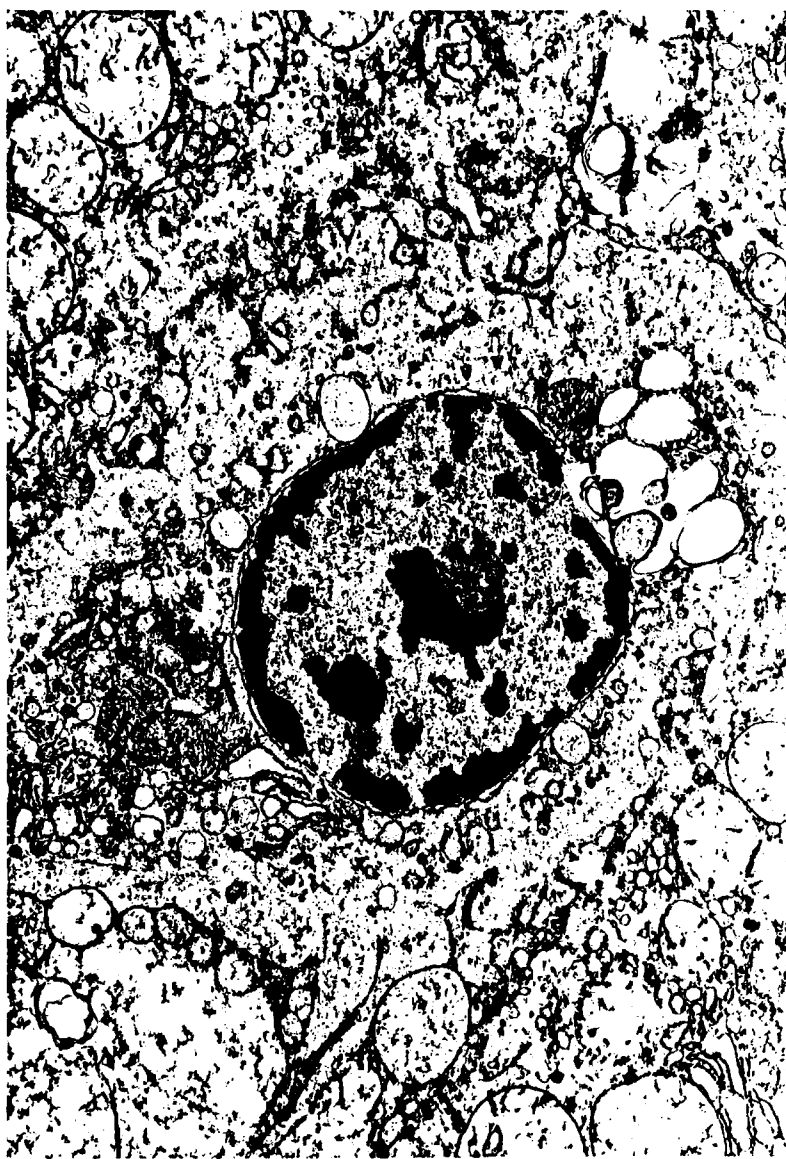


Foto 34.- Mitochondrias con matriz clara y desorganización de las crestas, rechazadas hacia la periferia. (Polo distal-- días). 21.000 x. a.f.



Foto 35.- Hipertrofia y dilatación del R.E. liso (Polo distal-7 días). 63.000 x. a.f.

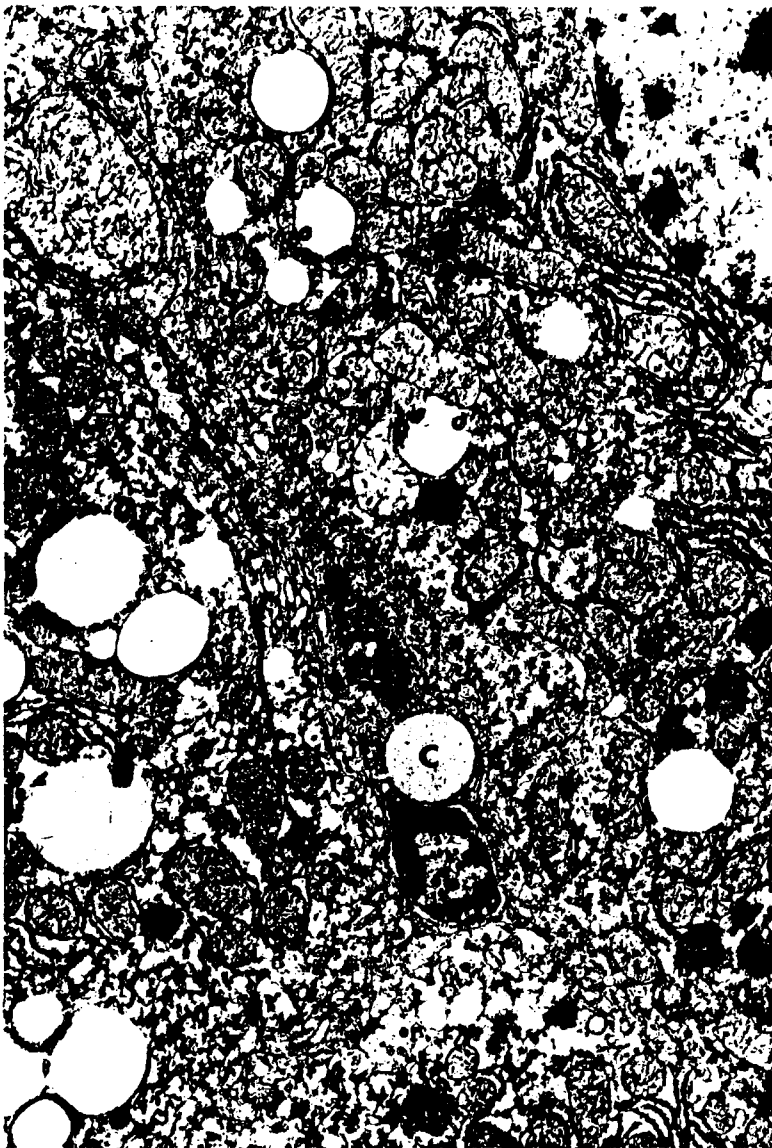


Foto 36.- Edema celular moderado; degeneración grasa; tumefacción mitocondrial leve; probable célula CALP (C), exhibiendo un típico acúmulo lipídico (Polo de sección-6 horas). 14.700 x. a.f.

264

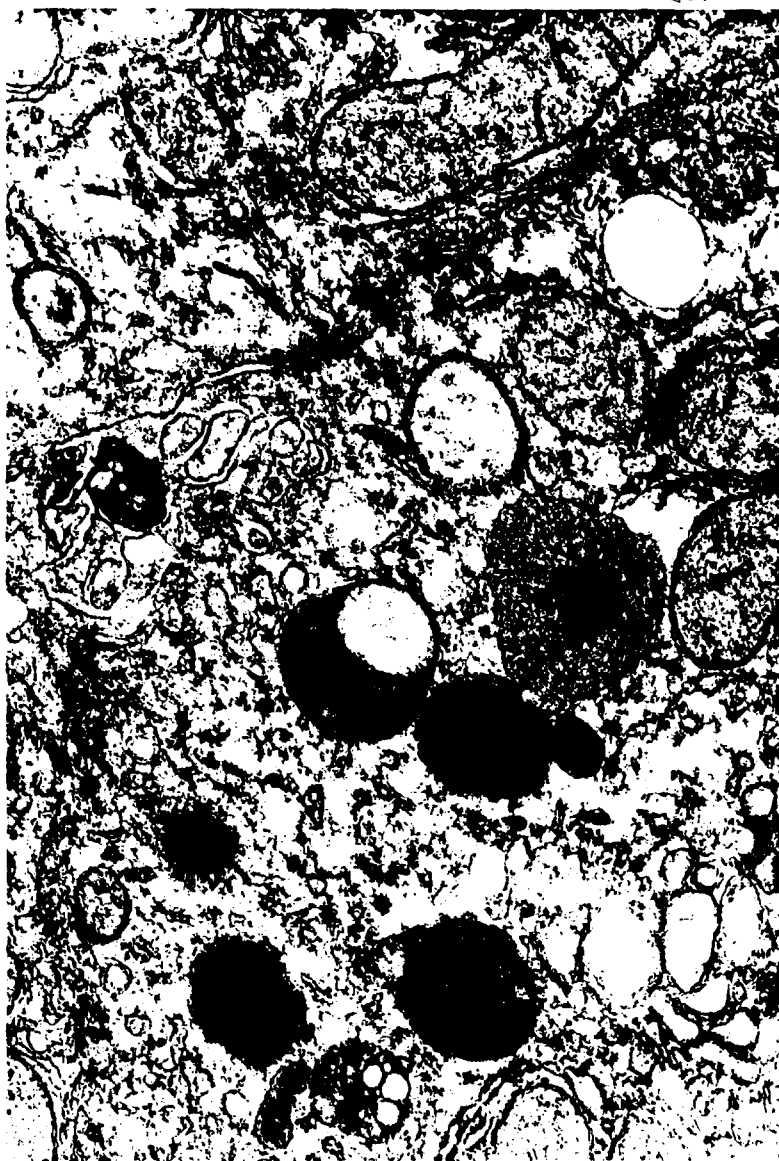


Foto 37.- Autofagosomas; tumefacción mitocondrial (Polo de sección-6 horas). 44.000 x. a.f.

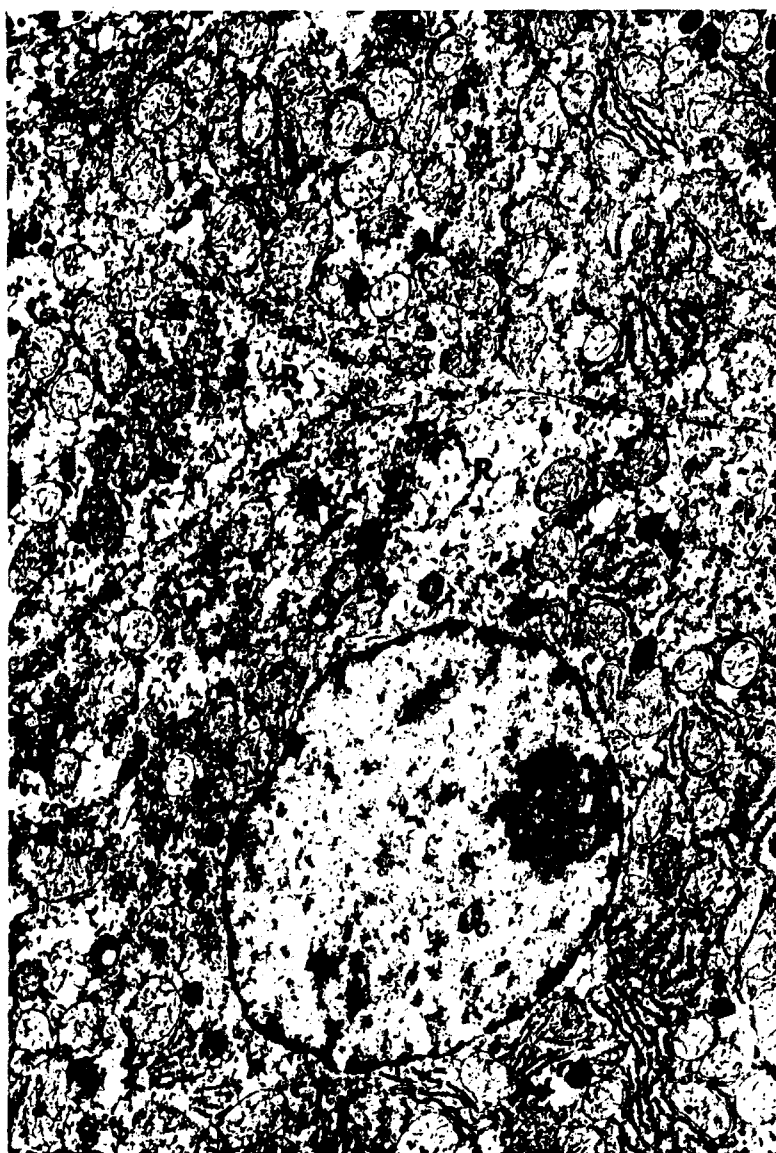


Foto 38.- Moderada dilatación del R.E. liso (R) y tumefacción mitocondrial (Polo de sección-24 horas). 14.400 x. a.f.





Foto 39.- Gran cuerpo lamelar (Polo de sección-24 horas).  
37.500 x. a.f.



Foto 40.- Necrosis celular; polimorfonucleares. (Polo de sección-48 horas). 8.700 x. a.f.

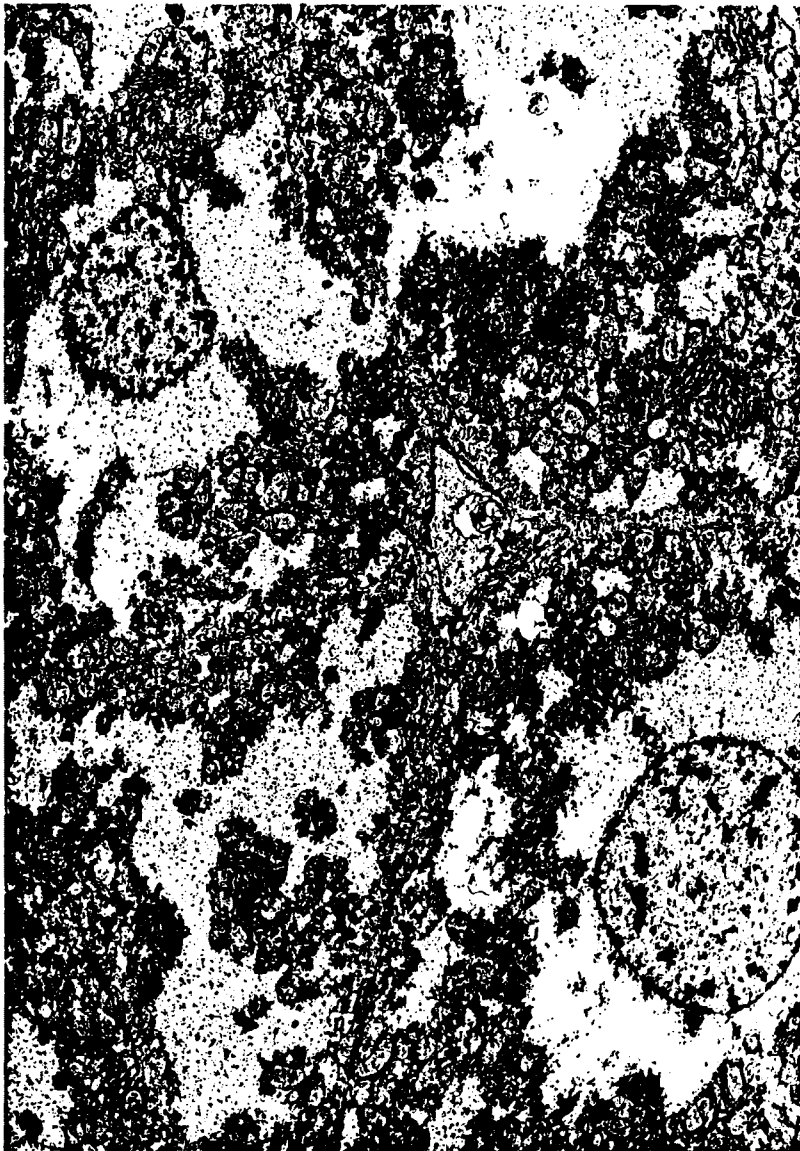


Foto 41.- Edema celular. (Polo de sección-7 días).  
4.860 x. a.f.

**D I S C U S I O N**  
=====

Desde que Ponfick <sup>1</sup> pudo constatar en 1894 que el hígado del perro tenía la capacidad de responder con un proceso de regeneración ante pérdidas sustanciales de tejido, se ha dedicado gran atención a este fenómeno.

Así, gran número de trabajos han puesto de manifiesto, que dicho atributo se extendía a otras especies, <sup>2,3,4,5</sup> incluido el hombre <sup>6,7,8,9,10,11</sup>.

Las investigaciones efectuadas por los diferentes autores han sido encaminadas, tanto al estudio de las características del proceso regenerativo en diferentes modelos experimentales, como a descifrar la búsqueda de la identidad del factor o factores responsables de dicho fenómeno.

En esta doble línea de investigación hemos enfocado nuestro trabajo, efectuando, por una parte, un estudio de los factores hormonales más estrechamente relacionados con la restauración del parénquima hepático (glucagón e insulina) y escogiendo una serie de parámetros bioquímicos a nivel subcelular, entre los que destacan el Citocromo P<sub>450</sub> y la fosfatasa ácida lisosomal, en las fracciones microsomal y mitocondrial respectivamente. Dicha elección se debe a la importancia intrínseca de estos factores y a la escasez de estudios al respecto, en la literatura.

Paralelamente, se ha venido correlacionando a la capacidad de regeneración del parénquima hepático otro hecho observado anteriormente <sup>35</sup>: la atrofia hepática consecutiva a la derivación portocava.

En 1920, Rous y Larimore <sup>86</sup> establecieron la hipótesis de que la sangre portal vehicularía ciertas sustancias hepatotróficas, que podrían influir decisivamente en la homeostasis y capacidad de regeneración del parénquima hepático.

Teniendo en cuenta, no obstante, la importancia del flujo sanguíneo que representa el sistema portal para el hígado, se ha discutido la posibilidad de que su influencia fuera debida a factores simplemente hemodinámicos (TEORIA VASCULAR). Mas, en esta última década, los modelos experimentales de Starzl, Price, Whittemore y Bucher, entre otros, parecen conceder a la sangre portal unas especiales cualidades hepatotróficas, que han sido principalmente atribuidas a las hormonas pancreáticas glucagón e insulina.

Sin embargo, la posibilidad de observar el fenómeno regenerativo en animales sometidos a evisceración de sus órganos abdominales, parece excluir a dichos agentes como iniciadores del proceso. Mas, éste se manifiesta en dichas circunstancias, con evidente retraso y menor cuantía, corrigiéndose dichas alteraciones después de la administración conjunta de ambas hormonas, lo que parece calificarlas como factores de primer orden en la modulación y expresión de dicho proceso.

Así, teniendo como base estos supuestos, se han efectuado determinaciones de ambos agentes hormonales, tanto a nivel portal <sup>150,223</sup> como en diferentes puntos de la circulación sistémica <sup>150,202,369</sup>; mas en ninguno de estos trabajos se efectuó una correlación dinámica de los niveles portales y suprahepáticos de ambas hormonas, condición indispensable a nuestro entender para apreciar, tanto la posible existencia de variaciones en su producción pancreática como su utilización por el hígado.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que las tasas de glucagón en sangre portal, experimentan ya a la primera hora de la resección hepática una sensible elevación, que tiene su mayor expresión a las 6 y 24 horas, persistiendo aún niveles elevados a las 48 horas, para retornar a la normalidad a las 72 horas.

Estos datos sugieren, en nuestra opinión, que el páncreas aumenta la producción de glucagón.

Bucher <sup>223</sup>, por su parte, ha podido registrar asimismo un aumento en sangre portal de los niveles de glucagón que se hace ya notable desde los primeros momentos del postoperatorio, alcanzando los mayores niveles a las 4 horas aproximadamente, y manteniéndose éstos sensiblemente elevados aún al término del primer día, en que finalizó su estudio.

Existe pues, gran similitud entre nuestros resultados y los de este autor.

También es de destacar, que el incremento registrado por Bucher fue mayor, hecho que probablemente deba ser referido al mayor porcentaje de hígado resecado (70%).

Por otra parte, Leffert <sup>202</sup> y Morley <sup>369</sup> determinaron los niveles de glucagón en sangre sistémica, procedente de ventrículo izquierdo y vena yugular, respectivamente.

El primero de ellos, pudo apreciar una notable elevación de los niveles de glucagón que ya era significativa a los 20 minutos de la intervención, alcanzando su punto máximo a las 3 horas aproximadamente. Dicha elevación persistía al cabo de 12 horas, en que concluyó la experiencia.

El segundo, efectuó sus determinaciones a las 6, 24, 48 y 72 horas, observando un aumento de la concentración de dicha hormona a las 6 horas, con una relativa disminución a las 24, para exhibir un nuevo incremento de mayor cuantía en las dos determinaciones restantes.

En ambas experiencias los animales sometidos a otros tipos de intervención quirúrgica experimentaron tan sólo una discretísima hiperglucagonemia.

Así pues, dichos estudios se efectuaron en distintas fases del proceso regenerativo, por lo que solo cabe establecer una relación a las 6 horas, en que ambos autores objetivaron un aumento de los niveles de glucagón en sangre sistémica, que eran el triple aproximadamente de los basales.

Nuestro estudio efectuado a nivel suprahepático, no arrojó elevaciones tan acusadas, pues si bien pudo apre-



ciarse un incremento en sangre suprahepática, éste no sobrepasó el 50% en ninguna fase del proceso.

Estas diferencias, quizá podrían ser debidas a la mayor cantidad de parénquima resecado por dichos autores (70%), lo que conlleva una drástica reducción de la masa hepática, siendo probablemente los hepatocitos remanentes, incapaces de captar todo el glucagón liberado por el páncreas.

En efecto, el propio Leffert <sup>202</sup>, pudo apreciar que los niveles de glucagón experimentaban un incremento lineal en relación a la cuantía de parénquima resecado y que, concretamente, para una resección del 30%, la elevación era aproximadamente del 100%, lo que sigue siendo todavía más elevado que el incremento registrado en nuestros animales.

En un segundo plano, otra circunstancia a tener en cuenta sería la menor edad de los animales empleados por estos autores en relación a los que conformaron nuestro estudio. A este respecto, ya se ha expuesto la importancia de dicho factor en el fenómeno regenerativo, <sup>23</sup> circunstancia que podría justificar también estas diferencias.

Por otra parte, contrastando los datos arrojados por nuestras determinaciones a nivel suprahepático con las grandes variaciones observadas a nivel portal, parece razonable afirmar que el hígado aumenta la utilización de glucagón de forma evidente, a las 6 y 24 horas y más discretamente, a la hora y a las 48 horas de la intervención.

Por último, correlacionando las variaciones registradas, tanto a nivel portal como suprahepático, con el estudio morfológico, se observa que estos cambios corresponden fundamentalmente al período de hipertrofia celular<sup>374</sup>, extendiéndose a las 48 horas, tiempo en el que se ha detectado el mayor índice de mitosis y que corresponde al período de hiperplasia celular.

Por lo que respecta a la insulina, hay que destacar que en nuestras determinaciones se ha empleado como "Standard" insulina de rata, en vez de insulina bovina, lo que supone en principio una mayor especificidad en la reacción inmunológica.

Los resultados obtenidos no son en modo alguno tan espectaculares y congruentes como los referentes al glucagón.

Así, en sangre portal, después de un pequeño incremento a la primera hora, se registra una marcada disminución a las 6 horas, con un discreto incremento a las 24 y 48 horas, que no llega a alcanzar los niveles basales, seguido de una nueva disminución a las 72 horas, sin haberse recuperado los niveles de los animales controles al cabo de 7 días.

Bucher <sup>223</sup>, ha podido registrar asimismo en sangre portal una disminución, si bien más acusada en las primeras horas, seguida de un incremento que alcanza su mayor expresión a las 8 horas, sin llegar a las cifras basales y una nueva disminución al final del primer día del postoperatorio.

Sakai <sup>150</sup>, por su parte, pudo constatar a las 24 horas una disminución en sangre portal, mucho más acusada que a nivel sistémico (arteria aorta). También apreció que las concentraciones a nivel de la vena pancreática disminuyen ligeramente, mientras en la vena mesentérica la disminución era notable; de estos datos deduce un consumo elevado de insulina a nivel periférico.

Así pues, ambos autores han observado que los niveles de dicha hormona en sangre portal se encuentran disminuidos en el proceso de regeneración hepática, lo que concuerda con nuestros resultados.

También es de destacar el que a los 7 días se siga registrando en nuestros animales dicha variación, mas ninguno de estos autores efectuó determinaciones tardías que nos permitieran contrastar nuestros resultados.

Por el contrario, en sangre suprahepática nuestros datos presentan escasas variaciones, si bien se ha podido registrar una ligera disminución mucho menos acusada que a nivel portal. Desde un punto de vista dinámico, se pudo constatar cierto paralelismo con respecto a las tasas

portales de insulina, salvo a la primera hora, en que disminuyó la concentración de insulina a nivel suprahepático, contrastando este dato con el discreto incremento en sangre portal.

Ya hemos referido que Sakai <sup>150</sup> observó asimismo una discreta disminución de las concentraciones de insulina en sangre aórtica, a las 24 horas.

Leffert <sup>202</sup>, por su parte, pudo constatar una disminución de los niveles de dicha hormona a nivel del ventrículo izquierdo, mas, ésta fue muy acusada, registrándose niveles próximos a 0; por el contrario, los animales sometidos a otros tipos de intervención quirúrgica solamente presentaron una ligera hipoinsulinemia.

Morley <sup>369</sup>, sin embargo, objetivó un ligero incremento, en determinaciones efectuadas a nivel de vena yugular, con recuperación de los niveles basales a las 72 horas.

Existe pues, salvo en los datos referidos por este último autor, unanimidad en destacar la existencia de una disminución de los niveles de insulina, tanto en sangre portal como suprahepática, a lo largo del proceso.

En nuestra experiencia, es de destacar el incremento registrado a nivel portal acompañado de una disminución a nivel suprahepático a la primera hora, que si bien es de escasa entidad, podría apuntar hacia un rápido incremento en la producción pancreática de dicha hormona y una mayor utilización hepática en un primer momento.

También parece desprenderse de nuestros resultados la posible existencia de una posterior amortiguación de la disminución de insulina a nivel portal, por parte del hígado a expensas de una menor utilización de dicha hormona a lo largo del proceso.

Habiéndose demostrado, por otra parte, en diversos modelos experimentales, la importancia de la insulina para la manifestación del fenómeno regenerativo, la hipoinsulinemia "paradójica" registrada en todas las investigaciones enunciadas, resulta difícil de explicar.

Leffert <sup>387</sup> llama la atención al respecto, recordando que esta cuestión no es el único "fenómeno paradójico" que se puede observar en el proceso de regeneración hepática. La insulina, que promueve la síntesis de DNA "in vitro", disminuye en este proceso. Por el contrario, el glucagón, que se muestra como un antagonista de estos efectos "in vitro" de la insulina <sup>176</sup>, aumenta espectacularmente en el proceso regenerativo.

De igual modo que la insulina, la tiroxina, que parece ser un estimulante "in vitro" de la síntesis de DNA <sup>165,201</sup>, disminuye a lo largo del proceso de regeneración hepática <sup>202</sup>.

Estas consideraciones podrían apuntar hacia la existencia de ciertos cambios a nivel de membrana celular, en el sentido de una mayor o menor afinidad hacia las hormonas pancreáticas.

En este sentido, Leffert <sup>202</sup>, en estudios "in vitro", ha observado que no existían variaciones importantes en la incorporación de insulina marcada a las 6 y 24 horas, por parte de membranas celulares obtenidas de animales hepatectomizados, respecto a las correspondientes a animales simplemente laparotomizados. En cuanto al glucagón, el índice de incorporación era similar a las 6 horas, encontrándose disminuido a las 24 horas.

Sin embargo, en posteriores estudios, efectuados "in vivo", sobre animales a los que se administraba insulina o glucagón, marcados con  $I^{125}$ ; se pudo apreciar un mayor índice de radioactividad hepática, en los animales sometidos a hepatectomía parcial, respecto a los controles, durante los 80 minutos posteriores a la intervención, en que se efectuó el estudio.

Estos datos son interpretados por Leffert, como indicativos de un incremento de la capacidad de incorporación de ambas hormonas pancreáticas, por parte del hígado en regeneración, al menos durante las primeras fases del proceso.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio a la primera hora postoperatoria, tanto los referentes a la insulina como al glucagón, coinciden con lo anteriormente dicho.

En resumen, se ha podido apreciar en nuestro estudio, un aumento significativo de los niveles de glucagón en sangre portal, al igual que en otras investigaciones. Por el contrario, las variaciones a nivel suprahepático fueron discretas.

Estos datos se interpretan como indicativos de un incremento, tanto en la producción pancreática de dicha hormona, como de su incorporación hepática.

Respecto a la insulina, las variaciones observadas durante la primera hora, podrían responder a las mismas consideraciones (hipótesis avalada por los estudios de Leffert <sup>387</sup>). La disminución consecutiva de sus niveles en sangre portal, podría ser debida, siguiendo a Sakai <sup>150</sup>, a un aumento del consumo periférico de dicha hormona.

El estudio morfológico a lo largo del proceso, ha puesto de manifiesto que en el polo de sección, producto de la hepatectomía, existen una serie de fenómenos inflamatorios, cicatriciales y de necrosis celular, que predominan sobre los cambios inherentes al proceso regenerativo en sí.

Por otra parte, las mismas determinaciones bioquímicas hablan por sí solas, en cuanto a la brusca disminución en dicho polo de sección, evidente ya a las 6 horas (tiempo de nuestra primera determinación) de todos los parámetros determinados, salvo las referentes a la fosfatasa ácida lisosomal, que incluso llega a superar los niveles basales en las últimas determinaciones practicadas.

Este dato, probablemente sea debido a la infiltración leucocitaria y, concretamente, a la abundancia de macrófagos, que el estudio morfológico ha evidenciado a nivel del polo de sección.

Así pues, con arreglo a estas consideraciones, al establecer la discusión de nuestros resultados bioquímicos en el proceso de regeneración hepática, nos referiremos concretamente, a los que corresponden al parénquima distal a la zona reseçada.

En otro orden de cosas, conviene destacar que la correlación polo distal/polo de sección ha sido extremadamente útil al poner de manifiesto, tanto las diferencias bioquímicas como morfológicas, existentes en ambas zonas de tejido.

Por último, se puede observar en algunos de nuestros resultados un cierto paralelismo en cuanto a la morfología



de la curva evolutiva de alguno de los factores en estudio (C.P<sub>450</sub>) y habría que referirlo al hecho de que en las muestras de tejido correspondientes al polo de sección, se incluían zonas tisulares hepáticas no afectadas por los fenómenos anteriormente enumerados y que incluso participaban en el proceso regenerativo, pudiéndose apreciar ocasionalmente, figuras de mitosis en el estudio morfológico.

Ajustándonos pues al parénquima distal a la zona de resección, se ha podido observar una importante disminución de los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> a lo largo del proceso regenerativo.

Ya en 1961, los trabajos de Fouts<sup>382</sup>, pusieron de manifiesto la existencia de una notable disminución de la actividad metabólica del sistema de biotransformación microsomal en ratas sometidas a hepatectomía parcial, que se mantenía aproximadamente unos 10 días, fenómeno no constatado en animales simplemente laparotomizados.

En recientes trabajos de Hino<sup>383</sup>, se ha observado que una resección hepática del 70%, produjo una disminución aproximada de un 20-40% en los niveles de P<sub>450</sub>, entre otros componentes proteicos, durante la primera semana, retornando a la normalidad a las 2 semanas de la intervención. Tampoco se pudo apreciar este hecho en animales sometidos a laparotomía.

Nuestros resultados concuerdan con los anteriormente citados, en los siguientes puntos:

- 1- La acusada disminución desde las primeras fases del proceso regenerativo.

- 2- La prolongación de dicho fenómeno a lo largo de la primera semana.

No obstante, el descenso de los niveles de  $P_{450}$  en nuestro trabajo fue más acusado y prolongado. Este hecho es difícil de interpretar, tanto más, si tenemos en cuenta que nuestra resección hepática fue menor.

Quizá se podría hipotetizar que nuestros animales, de mayor edad que los empleados por Hino, acusarían con mayor intensidad el stress quirúrgico y tendrían mayor dificultad en la restitución de los parámetros habituales de dicho citocromo, lo que se traduciría en una mayor lentitud de dicha restitución.

Por otra parte, el estudio morfológico puso de manifiesto una hipertrofia del R.E. liso, que ya era evidente a los 3 días de la intervención y aún persistía a los 7 días. Se podría pues convenir en la existencia de un R.E. hipertrófico hipoactivo en nuestros animales.

Anteriormente, se ha referido el hecho de que ciertas drogas tales como el tetracloruro de carbono <sup>332,333</sup> y fenobarbital + aminotriazol <sup>334</sup>, entre otras, pueden llegar a producir un R.E. de estas características.

Se podría razonar entonces la posibilidad de que el éter, anestésico utilizado en nuestro trabajo, hubiera desencadenado el fenómeno descrito, mas dicho anestésico, fue también utilizado por Hino. Tampoco se explicarían entonces las diferencias entre los diferentes grupos de animales, ya que en todos se siguió la misma pauta y tiempo aproximado de anestesia y por último, recientes investigaciones de Ross <sup>384</sup> han evidenciado que el éter produce un incremento en los

niveles de Citocromo P<sub>450</sub> a grandes dosis de inhalación, lo que parece invalidar la posibilidad de una inducción anestésica del sistema de biotransformación microsomal, en nuestro trabajo experimental.

Por otra parte, en el estudio de Hino no se estableció una correlación morfológica, hecho que, sumado a la ausencia de otros estudios sobre el comportamiento de los niveles de P<sub>450</sub> en el proceso de regeneración hepática, impide la aclaración de este punto.

Existe pues, una disminución de los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> en el proceso regenerativo, fenómeno que ha sido igualmente detectado en células en fase de crecimiento rápido, sometidas por lo tanto a una activa síntesis proteica, como los hepatocitos fetales<sup>385</sup> y las correspondientes a diversos hepatomas<sup>336,338</sup>.

También es dado observar dicho fenómeno en animales portadores de tumor en otras localizaciones<sup>336,337</sup>, lo que Brown<sup>336</sup> interpreta como una utilización de este sistema biotransformador con el objeto de disminuir los nocivos efectos para el organismo de ciertas sustancias carcinógenas sintetizadas por el tumor, transformándolas en metabolitos de baja toxicidad. La sobrecarga de dicho sistema, terminaría agotando la capacidad de aquel, lo que podría explicar la disminución de la concentración de P<sub>450</sub> en estos animales.

En el proceso de regeneración hepática, teniendo en cuenta las analogías entre las células hiperplásicas intrahepáticas, a este fenómeno, y las células neoplásicas,<sup>372</sup> la disminución de los niveles de P<sub>450</sub> podría ser debida,

según lo anteriormente expuesto, a una mayor utilización del sistema de biotransformación microsomal, metabolizando éste, ciertas sustancias producidas por las células hiperplásicas o, como postula Hilton <sup>388</sup>, a una orientación del metabolismo celular hacia la restauración tisular en menoscabo de la síntesis de enzimas pertenecientes a dicho sistema, entre ellas, el Citocromo P<sub>450</sub>.

Abundando en este punto, se ha podido observar en animales recién nacidos, que diversas enzimas pertenecientes al sistema de biotransformación microsomal son sintetizadas en el R.E. rugoso y posteriormente, transferidas al R.E. liso <sup>385</sup>. Se podría argumentar pues que dicho R.E. rugoso desviaría su producción hacia la síntesis de otras proteínas y enzimas diferentes a las de dicho sistema, hipótesis que igualmente explicaría la disminución del Citocromo P<sub>450</sub> así como de diversas actividades enzimáticas microsomales en el proceso de regeneración hepática.

Rifiriéndonos seguidamente a las proteínas contenidas en la fracción microsomal, éstas exhibieron un incremento a las 6 horas que se prolongó hasta las 24, experimentando posteriormente un descenso notable a las 48 horas, exhibiendo posteriormente una recuperación paulatina, que fue total e incluso ligeramente superior al final de nuestro estudio.

Así pues, se pudo objetivar un incremento a lo largo del período de hipertrofia celular, con disminución coexistente con el máximo índice de mitosis detectado, para recuperar finalmente los niveles basales.

No hemos podido correlacionar nuestros resultados con los de otros autores, al no haber encontrado referencias expresas a la evolución cuantitativa de las proteínas microsomales a lo largo del proceso en las publicaciones consultadas, incluso en las investigaciones de Hino referidas anteriormente.

Sin embargo, las cifras basales obtenidas concuerdan con las de otros autores, <sup>325,385</sup> que oscilan entre 16'6 y 22'2.

De cualquier modo, los valores hallados guardan estrecha relación con los hallazgos morfológicos habituales observados dentro del proceso regenerativo y con nuestro propio estudio morfológico, en el que se pudo constatar un incremento del R.E. durante el período de hipertrofia celular.

En lo que respecta a los lípidos y fosfolípidos microsomales, se pudo constatar un incremento a las 24 horas, al igual que las proteínas contenidas en dicha fracción.

No es de extrañar que los resultados obtenidos en el período de hipertrofia celular guarden una semejanza con los referentes a las proteínas microsomales, pues éstas

parecen determinar en cierto modo la síntesis de fosfolípidos <sup>386</sup>, cuya función es determinante para mantener ciertas condiciones hidrofóbicas en las membranas del R.E., así como para ciertas actividades enzimáticas a nivel de las membranas de dicho sistema <sup>385</sup>.

Por otra parte, después del incremento existente a las 24 horas, los niveles de fosfolípidos disminuyeron en las restantes determinaciones. Es interesante destacar al respecto, que de igual modo que el P<sub>450</sub>, se ha podido objetivar en el hepatoma de Morris <sup>390</sup> una disminución de los fosfolípidos microsomales así como variaciones notables en la composición estructural <sup>391</sup>; este último hecho no se ha podido apreciar en el proceso regenerativo hepático <sup>391</sup>. En este último trabajo no se cita el contenido total de fosfolípidos microsomales, por lo que no podemos hacer un análisis comparativo de nuestros resultados.

Por último, los datos obtenidos en los animales controles, en nuestro estudio, con respecto a la valoración de fosfolípidos, son discretamente más elevados que los referidos por Dallner <sup>386</sup> (196 µg P Lipid/g. de hígado), mas dicho autor no refiere el peso ni edad de los animales empleados, lo que no nos permite analizar las causas de tales diferencias con respecto a nuestros controles (248 µg P Lipid/g. de hígado).

En conclusión, los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> se hallan sensiblemente disminuídos a lo largo del proceso de regeneración hepática, coexistiendo con una hipertrofia y dilatación del R.E. liso, fenómenos que traducen la existencia de un retículo endoplásmico hipertrófico hipoactivo; hecho éste que pudiera ser debido : a una sobrecarga impuesta al sistema de biotransformación microsomal por ciertas sustancias producidas por las células hiperplásicas; a una orientación del metabolismo celular hacia la restauración tisular, en menoscabo de la síntesis de enzimas pertenecientes a dicho sistema, entre ellas, el Citocromo P<sub>450</sub>; o bien, a la suma de ambos factores.

Respecto a las proteínas, lípidos y fosfolípidos microsomales, se registró un incremento de estos parámetros en el período de hipertrofia celular, como cabría esperar, con arreglo a la evolución morfológica habitual en el proceso de regeneración hepática.

Los lisosomas se incluyen en el proceso de fraccionamiento celular dentro de la fracción mitocondrial, debido a sus características físicas. Así pues, la actividad de la fosfatasa ácida en dicha fracción se interpreta como reflejo de la desaparición y formación de lisosomas.

En nuestro trabajo, hemos podido apreciar una disminución a los 2/3 aproximadamente, de los niveles basales, destacando el hecho de que a los 14 días aún no se hayan restituido los niveles de actividad detectados en los animales controles.

No obstante, Fiszer-Szafarz<sup>360</sup> ha detectado en dicha fracción mitocondrial, un ligero incremento del 10% de la actividad basal, aproximadamente a las 9 horas, para disminuir ésta, a las 30 horas, a un 20%, iniciándose posteriormente una lenta restitución que, a los 11 días, significaba tan solo un 40% de la actividad basal.

Estableciendo un análisis comparativo, hay que tener en cuenta que dicho autor efectuó una resección del 70%, por lo que parece congruente que dicha enzima sufriera un descenso más acusado que el observado en nuestro estudio; por otra parte, nuestros datos concuerdan en cierto modo, con los de Fiszer-Szafarz, puesto que dicho autor pudo apreciar que, a los 11 días los niveles de actividad se encontraban aún notablemente descendidos respecto a los basales.



Parece pues, que la restauración del sistema lisosomal se efectúa con gran lentitud.

También existe, con arreglo a este parámetro, una estrecha correlación con las células tumorales, las cuales exhiben asimismo, una disminución de la actividad lisosomal .361,362,363,364

En cuanto a las proteínas mitocondriales, se ha observado una disminución de sus niveles, más acusada en las primeras fases, a nivel del polo de sección, detectándose ocasionalmente, alteraciones ultraestructurales. No nos ha sido posible hallar en nuestra revisión bibliográfica otras determinaciones de proteínas, en la fracción mitocondrial, con las que poder contrastar nuestros resultados.

En resumen, se ha podido apreciar en nuestro estudio, una clara disminución de la fosfatasa ácida en la fracción mitocondrial, como exponente de la actividad y desaparición lisosomal, sin que parezca existir una renovación paralela del sistema lisosomal, cuya restauración se efectúa con gran lentitud.

Se observó asimismo una disminución de las proteínas contenidas en dicha fracción, a lo largo del proceso.

Los cambios morfológicos, como se ha expuesto con anterioridad, fueron sensiblemente diferentes en las zonas de parénquima estudiadas.

Así, en el polo de sección, predominaron los fenómenos de necrosis celular, inflamatorios y cicatriciales, si bien el parénquima inmediatamente adyacente a la zona de necrosis, participaba del proceso regenerativo, pudiéndose observar ocasionalmente, la presencia de mitosis.

En el polo distal, se apreció en cambio un fenómeno regenerativo evidente, sin otras alteraciones superpuestas.

Así, cabe destacar el aumento del tamaño celular, la desglucogenización, el incremento de vacuolas lipídicas y la hipertrofia del retículo endoplásmico, fenómenos observados reiteradamente en el proceso de regeneración hepática y encuadrados dentro del período de hipertrofia celular. Su significación fue comentada en la introducción de esta tesis, por lo que no insistiremos sobre ello.

Es de destacar asimismo, la observación de fenómenos de autofagia celular, traducidos por la presencia de autofagosomas, fundamentalmente a las 6 y 24 horas, tiempos en los que, igualmente, se pudieron detectar los más altos niveles de glucagón en sangre portal.

Parece existir pues una estrecha correlación entre la hiperglucagonemia y la presencia de autofagosomas en nuestro estudio, lo que concuerda con otro tipo de investigaciones

que señalan a dicha hormona como responsable del fenómeno de autofagia celular <sup>347,348,349,350,351</sup>.

Las variaciones experimentadas por el retículo endoplásmico y las mitocondrias, ya han sido referidas, a propósito de los resultados bioquímicos.

Respecto a las características del fenómeno regenerativo en nuestro trabajo, éstas guardan una estrecha correlación con las investigaciones de Grosjean-Rassenfosse <sup>374</sup>, el cual efectuó una resección de parénquima similar a la efectuada por nosotros.

Así, hemos podido apreciar un mayor índice de mitosis a las 48 horas; sin embargo, nuestro estudio arrojó un mayor índice de mitosis a las 24 horas que a las 72, en oposición a los resultados de dicho autor. A partir de este último tiempo, no se observaron figuras de mitosis, de acuerdo con la totalidad de las investigaciones sobre hígado en regeneración.

En cuanto a la distribución de figuras de mitosis, en nuestro estudio no se pudo evidenciar una especial distribución en ninguna zona del lobulillo.

Se ha podido detectar un incremento de células multinucleadas, al igual que en otros estudios <sup>25,237</sup>, como expresión de células que han superado las diversas fases precedentes a la mitosis, sin experimentar ulterior división.

Por último, el fenómeno regenerativo en este tipo de resecciones es logicamente inferior en cuantía y se manifiesta más tardíamente, respecto al provocado con otras hepatectomías de mayor entidad.

Refiriéndonos seguidamente a las células perisinusoidales, se pudo apreciar que las células de Kupffer eran prominentes a las 6 y 24 horas, constatándose un significativo aumento en el número de éstas a las 72 horas, lo que confirma su participación en este fenómeno, si bien de forma más tardía, como han comprobado diversos autores <sup>25,370</sup>.

Dentro de las células perisinusoidales, no se pudieron observar variaciones significativas en las células CALP o células perisinusoidales almacenadoras de lípidos (Fat storing cells).

Estas, fueron descritas por Ito <sup>392</sup>, y se diferencian de las células de Kupffer, entre otras razones, por exhibir en su citoplasma una o varias gotas lipídicas (de ahí su nombre), hecho que es extremadamente raro en estas últimas. <sup>393</sup>

Por otra parte, poseen ciertas semejanzas con las células intersticiales de Leydig del testículo, las cuales participan notablemente en la hidroxilación esteroidea <sup>394,395</sup>.

Su función se desconoce actualmente, si bien se barajan varias posibilidades: Hidroxilación esteroidea <sup>394</sup>; síntesis de lípidos, almacenamiento de lípidos y Vitamina A <sup>396</sup>; síntesis de fibras colágenas y de reticulina <sup>397</sup>.

En resumen, se han podido determinar diferencias morfológicas importantes entre el polo de sección y el parénquima distal, que, al mismo tiempo, han sido de gran utilidad en la interpretación de nuestros resultados bioquímicos.

La temprana manifestación de los fenómenos de autofagia celular es correlacionable con el rápido incremento de los niveles de glucagón en sangre portal, evidenciado en nuestro estudio.

Por último, se ha podido constatar una menor magnitud y un retraso en la manifestación del fenómeno respecto a hepatectomías de mayor cuantía.

**R E S U M E N**  
=====

Nuestro estudio del proceso de regeneración hepática se ha enfocado desde una doble perspectiva: 1) Profundizar en el conocimiento del control de dicho fenómeno y 2) Efectuar un estudio del proceso en sí, dirigiendo nuestra atención especialmente a una serie de factores, por su importancia y por la escasez de investigaciones al respecto, dentro del proceso de regeneración hepática.

Respecto al primer punto, se efectuó un estudio de las hormonas pancreáticas, insulina y glucagón, que en los últimos años se han revelado como agentes de notable importancia en la manifestación y expresión de dicho proceso.

Anteriormente, se habían llevado a cabo otros estudios sobre las variaciones de los niveles sanguíneos de ambas hormonas, en diversos puntos de la economía (sangre portal, vena yugular, ventrículo izquierdo, arteria aorta). En nuestro caso, consideramos oportuno efectuar una correlación de los niveles de insulina y glucagón en sangre portal y suprahepática, para estudiar el comportamiento del páncreas y del hígado, en cuanto a la producción y utilización, respectivamente, de ambas hormonas.

En nuestro trabajo experimental, se pudo apreciar un notable aumento de los niveles de glucagón en sangre portal, sin que existiera una correlación similar a nivel suprahepático.

Estos datos, se interpretaron como indicativos de un aumento en la producción pancreática y en el consumo hepático de dicha hormona, fundamentalmente en el período de hipertrofia celular, si bien, los niveles de glucagón en sangre portal, permanecían elevados hasta las 72 horas.

Así pues, nuestro estudio permite calificar al glucagón como un factor hepatotrófico de primer orden, íntimamente relacionado con el proceso de regeneración hepática.

Por el contrario, solamente se pudo observar a la primera hora, un ligero incremento de los niveles de insulina en sangre portal, acompañado de una discreta disminución a nivel suprahepático, lo que podría apuntar en el mismo sentido que lo referido para el glucagón; sin embargo, en posteriores determinaciones, se observó un notable descenso de las tasas de insulina portal, que se mantuvieron durante los 7 días que duró nuestro estudio; por el contrario, a nivel suprahepático, no se pudieron objetivar variaciones significativas.

Estos datos, podrían traducir la existencia de un aumento del consumo periférico de insulina, así como una disminución de su utilización por el hígado.

Así pues, este descenso "paradójico" de los niveles de insulina portales, no permiten extraer conclusiones claras y precisas como en el caso del glucagón.



En cuanto al segundo punto, se efectuó un estudio del Citocromo P<sub>450</sub> y de la Fosfatasa Acida Lisosomal a lo largo del proceso, acompañados de otras determinaciones, tales como las proteínas, lípidos y fosfolípidos microsomales y las proteínas de la fracción mitocondrial.

Todas las determinaciones bioquímicas se efectuaron, tanto en el polo de sección, producto de la hepatectomía, como en el parénquima distal al mismo.

Del mismo modo, se efectuó una correlación morfológica, que puso de manifiesto un predominio de los fenómenos de necrosis celular, inflamatorios y cicatriciales en el polo de sección, si bien las células adyacentes a la zona de necrosis participaban, en cierto modo, del fenómeno regenerativo e incluso, se pudo constatar ocasionalmente la presencia de mitosis.

Todas las determinaciones bioquímicas en dicha zona, objetivaron una rápida disminución de los valores basales, sin posterior recuperación, salvo en el caso de la Fosfatasa Acida Lisosomal, lo que se interpreta que es debido a la infiltración leucocitaria y, concretamente, a la presencia de macrófagos en dicha zona, puestos de manifiesto por el estudio morfológico. Tampoco se pudo observar, al igual que en el parénquima distal, una restitución de las proteínas mitocondriales al final de nuestro estudio.

En el parénquima distal, el fenómeno regenerativo desencadenado fue lógicamente, de menor entidad y se manifestó con cierto retraso respecto a otras investigaciones en las que se efectuaron resecciones más amplias.

Dentro del período de hipertrofia celular, además del incremento en el tamaño celular, es de destacar la presencia de autofagosomas, fundamentalmente a las 6 y 24 horas, fenómeno que se correlacionó con los mayores niveles de glucagón en sangre portal.

Otros fenómenos objetivados habitualmente en el proceso regenerativo hepático, tales como desglucogenización, incremento de vacuolas lipídicas e hipertrofia del retículo endoplásmico, también fueron apreciados dentro de este período; observándose, desde el punto de vista bioquímico, un incremento de las proteínas, lípidos y fosfolípidos microsomales.

El fenómeno mitótico fue más acusado a las 48 horas y no se pudo evidenciar una distribución preferente de las figuras de mitosis en ninguna zona del lobulillo.

En cuanto a los niveles de Citocromo P<sub>450</sub>, estos experimentaron una notable disminución a lo largo del proceso, acompañándose de una restitución final de los valores de proteínas en la fracción microsomal, poniendo de manifiesto el estudio morfológico una hipertrofia y dilatación del R.E. liso; es decir, se pudo constatar la existencia

de un R.E. hipertrófico hipoactivo, lo que sugiere un desgaste del sistema de biotransformación microsomal, sin una restitución paralela de éste.

Respecto a la Fosfatasa Acida Lisosomal, la actividad de esta enzima en la fracción mitocondrial, sufrió un rápido y notable descenso sin recuperación paralela, lo que traduce una utilización importante de dicha enzima, sin que exista una restauración paralela del sistema lisosomal.

Estos hechos fueron interpretados como indicativos de un cambio en la orientación del metabolismo celular hacia la restitución tisular, en menoscabo de la síntesis de otras enzimas con una función más determinada, tales como el Citocromo  $P_{450}$  y la Fosfatasa Acida Lisosomal, cuya restitución se efectúa con mayor lentitud.

Por otra parte, es de destacar el hecho de que las células tumorales exhiban igualmente, tanto una disminución de los niveles de Citocromo  $P_{450}$  como de la actividad de la Fosfatasa Acida Lisosomal, lo que viene a señalar la estrecha similitud de las células tumorales y las células hiperplásicas, propias del proceso regenerativo hepático.

**CONCLUSIONES**  
=====

- Se ha podido constatar en nuestro trabajo experimental, un notable aumento de los niveles de glucagón en sangre portal sin que exista una correlación similar a nivel suprahepático, hecho que se interpreta como indicativo de un aumento de la producción pancreática de glucagón y de su consumo hepático, lo que, a nuestro entender, califica a dicha hormona como un factor hepatotrófico de primer orden, íntimamente relacionado con el proceso de regeneración hepática.
- El aumento de los niveles de glucagón fue más acusado a las 6 y 24 horas, tiempos en los que alcanzaron su mayor expresión los fenómenos de autofagia celular, lo que sugiere una notable participación de dicho agente hormonal, en la manifestación de este fenómeno.
- La insulina sufrió, en cambio, un descenso "paradójico" a nivel portal a lo largo del proceso, sin que tuviera una traducción similar a nivel suprahepático. Tan solo las variaciones registradas a la primera hora postoperatoria apuntarían hacia las mismas conclusiones que las enunciadas para el glucagón mas, éstas no fueron valorables ni se mantuvieron en determinaciones posteriores, por lo que no se pueden extraer conclusiones definitivas de nuestros resultados, al igual que los de otros autores.

- En el polo de sección, producto de la hepatectomía, predominaron los fenómenos de necrosis celular, inflamatorios y cicatriciales, y en el parénquima distal, los inherentes al proceso regenerativo.
- Se pudo objetivar, durante el período de hipertrofia celular, un incremento del R.E. que se pudo correlacionar con los diferentes componentes estructurales (proteínas, lípidos y fosfolípidos microsomales).
- Los niveles de Citocromo P<sub>450</sub> experimentan una notable disminución a lo largo del proceso, coexistiendo con una hipertrofia y dilatación del R.E. liso. Así pues, la re-sección hepática desencadena la producción de un R.E. hipertrófico hipoactivo, lo que sugiere un desgaste del sistema de biotransformación microsomal, sin restitución paralela de sus componentes, entre ellos, el Citocromo P<sub>450</sub>.
- La temprana disminución de la actividad de la Fosfatasa Ácida en la fracción mitocondrial y su extensión a lo largo del proceso regenerativo, traduce una notable participación de los lisosomas en las primeras fases de éste, sin que parezca existir una renovación concomitante del sistema lisosomal.

- Estos dos últimos puntos, traducen una desviación del metabolismo celular hacia la restauración tisular, en menoscabo de la síntesis de estas sustancias.

**B I B L I O G R A F I A**  
=====



- 1.- PONFIK, E.: - " Experimental contribution on the pathology of the liver". Wirchow's Arch. Path. Anat. 138: 81, 1894.
- 2.- HIGGINS, G.M.; ANDERSON, R.M.: - " Experimental pathology of the liver; restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal ". Arch. Path. 12:186, 1931.
- 3.- YOKOYAMA, H.O.; WILSON, M.E.; TSUBOI, K.K.; STOWELL, R.E.: - " Regeneration of mouse liver after partial hepatectomy". Cancer Res. 13:80, 1953.
- 4.- HIGGINS, G.M.; MANN, F.C.; PRIESTLEY, J.T.: - " Experimental pathology of the liver. X. Restoration of the liver of the domestic fowl ". Arch. Path. 14:491, 1932.
- 5.- MANNIX, H. Jr.; CORNELL, G.; O'SULLIVAN, W.D.: - " The regeneration of the liver in the monkey and in the monkey with portocaval shunt ". Surgery, 40:874, 1956.
- 6.- ARONSEN, K.F.; ERICSON, B.; NOSSLING, B.; NYLANDER, G.; PIHL, B.; WALDESKOG, B.: - " Evaluation of the hepatic regeneration by scintillation scanning, cholangiography and angiography in man ". Ann. Surg., 171:567, 1970.
- 7.- PACK, G.T.; ISLAMI, A.H.; HUBBARD, J.C.; BRASFIELD, R.D.: - " Regeneration of human liver after major hepatectomy". Surgery, 52:617, 1962.
- 8.- McDERMOTT, W.V. Jr.; GREENBERG, N.J.; ISSELBACHER, K.J.; WEBER, A.L.: - " Major hepatic resection: Diagnostic techniques and metabolic problems ". Surgery, 54:56, 1963.

- 9.- PARKER, J.; SIEMSEN, J.K.: -" Liver regeneration following hepatectomy, evaluated by scintillation scanning". Radiology, 88:342, 1967.
- 10.- FOSTER, J.H.; LAWLER, M.R.; WELLBORN, M.B. Jr.; HOLCOMB, G.W. Jr.; SAWYERS, J.L.: -" Recent experience with major hepatic resection ". Ann. Surg., 167:651, 1968.
- 11.- MONACO, A.P.; HALLGRIMSON, J.; McDERMOTT, W.V. Jr.: -" Multiple adenoma (hamartoma) of the liver treated by subtotal (90%) resection; morfological and functional studies of regeneration ". Ann. Surg., 159:513, 1964.
- 12.- WILLIAMS, R.B. Jr.: -" Liver regeneration in rats on diets that produce cirrhosis ". Mil. Surg. 109:435, 1951.
- 13.- MORRISON, G.R.; BROCK, F.E.; KARL, I.E.; SHANK, R.E. :-  
" Quantitative analysis of regenerating and degenerating areas within the lobule of the carbon tetrachloride injured liver ". Arch. Biochem., 111:448, 1965.
- 14.- KELTY, R.H.; BAGGENSTOSS, A.H.; BUTT, H.R.: -" The relation of the regenerated liver nodule to the vascular bed in cirrhosis ". Gastroenterology, 15:285, 1950.
- 15.- POPPER, H.: -" Transition of hepatitis into cirrhosis ". Am. J. Digest. Dis., 2:397, 1957.
- 16.- WEINBREN, K.: -" The pathology of hepatitis ". J. Path. Bact., 64:395, 1952.
- 17.- NEEDHAM, A.E.: -" Regeneration and wound-healing". Ed. 1. Methuen and Co.; Ltd. London, 1952.
- 18.- WEINBREN, K.: -" Regeneration of the liver ". Gastroenterology, 37:657, 1959.

- 19.- SIGEL,B.; ACEVEDO,F.J.; DUNN,M.R.:-" The effect of partial hepatectomy on autotransplanted liver tissue ". Surg. Gynecol. Obstet. , 117:29, 1963.
- 20.- ARONSEN,K.F.; ERICSSON,B.; PIHL,B.:-" Metabolic changes following major hepatic resection ". Ann. Surg., 169:102, 1969.
- 21.- LIN,T.Y.; CHEN,C.C.:-" Metabolic function and regeneration of cirrhotic and non-cirrhotic livers after hepatic lobectomy in man ". Ann. Surg., 162:959, 1965.
- 22.- BUCHER,N.L.R.; SWAFFIELD,M.N.:-" The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised ". Cancer Res., 24:1611, 1964.
- 23.- BUCHER,N.L.R.; SWAFFIELD,M.N.; DITROIA,J.F.:-" The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-C<sup>14</sup> into the DNA of regenerating rat liver ". Cancer Res., 24:509, 1964.
- 24.- McDONALD,R.A.; ROGERS,A.E.; PECHET,G.:-" Regeneration of the liver. Relation of regenerative response to size of partial hepatectomy ". Lab. Invest., 11:544, 1962.
- 25.- FABRIKANT,J.I.:-" The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver ". J. Cell. Biol., 36:551, 1968.
- 26.- SIGEL,B.; BALDIA,L.B.; DUNN,M.R.; MENDUKE,H.:-" Humoral control of liver regeneration ". Surg. Gynecol. Obstet. 124:1023, 1967.

- 27.- SIGEL,B.; BALDIA,L.B.; MENDUKE,H.; FEIGL,P.:-" Independence of hiperplastic and hipertrophic responses in liver regeneration ".Surg.Gynec.Obstet., 125:95,1967.
- 28.- JOHNSON,H.A.:-" Liver regeneration and the Critical Mass hypothesis ". Am.J. Path., 57:1, 1969.
- 29.- MAZIA,D.:-" The life history of the cell ". Am. Sci. 44:1, 1956.
- 30.- HARTMANN,M.:-" Uber experimentelle unsterblichkeit von protozoenindividuen ". Archiv fur Protistenkunde, 45: 973, 1928.
- 31.- WEINBREN,K.:-" The portal blood supply and regeneration on the rat liver ". Brit. J. Exp. Path., 36:583, 1955.
- 32.- FISHER,B.; LEE,S.H.; FISHER, E.R.; SAFFER, E.:-" Liver regeneration following portacaval shunt ". Surgery, 52:88, 1962.
- 33.- WEINBREN,K.; STIRLING,G.A.; WASHINGTON,S.L.A.; HOOPER, S.B.; LAUGHLIN, J.:-" Critical cytoplasmic mass and the initiation of the proliferative response in the rat liver ". Brit.J. Exp.Path., 52:583, 1971.
- 34.- ECK,N.V.:-" On the question of ligature of the portal vein ". Voyenno Med.J. 130:1, 1877. (Transl. Surg. Gynecol. Obstet. 96:375, 1953).
- 35.- HAHN,M.; MASSEN,O.; NENCKI,M.; PAWLOW,J.:-" Die Eck sche fistel zwischen der unteren hohlvene und der pfortader und ihre polgen fue den organismus ". I. Arch. Exp. Path. Pharmakol., 32:161, 1893.

- 36.- WARREN, W.D.; RUDMAN, D.; MILLIKAN, W.; GALAMBOS, J.T.; SALAM, A.A.; SMITH, R.B.: - "The metabolic basis of portosystemic encephalopathy and the effect of selective vs nonselective shunts ". Ann. Surg., 180:573, 1974.
- 37.- DAVIDSON, F.; DENIZE, A.; HURWITT, E.S.; LAUFMAN, H.: - "Reversal splenocaval anastomosis for prevention of postshunt ammonia intoxication ". Surg. Gynecol. Obstet., 125:815, 1967.
- 38.- JOLLY, P.C.; YOUNGER, R.K.; FOSTER, J.H.: - "Hepatic metabolic response to complete and partial portal venous diversion ". Surg. Gynecol. Obstet., 121:795, 1965.
- 39.- CUSCHIERI, P.A.; BAKER, P.R.; HOLLEY, M.P.; HANSON, C.: - "Portocaval shunt in the pig. I. Effect on survival, behavior, nutrition and liver function ". J. Surg. Res. 17:387, 1974.
- 40.- BAKER, P.R.; CUSCHIERI, A.; HANSON, C.: - "Portocaval shunt in the pig. II. Evaluation of functional changes of the liver by a compartmental bromsulphthalein (BSP) test ". J. Surg. Res., 17:397, 1974.
- 41.- McDERMOTT, W.V.Jr.; BARNES, B.A.; NARDI, G.L.; ACKROID, F.W.: - "Postshunt encephalopathy ". Surg. Gynecol. Obstet., 126:585, 1968v
- 42.- McDERMOTT, W.V.Jr.; ADAMS, R.D.: - "Episodic stupor associated with Eck fistula in human with particular reference to metabolism of ammonia ". J. Clin. Invest. 1: 1, 1954.

- 43.- McDERMOTT,W.V.Jr.:-" Evaluation of the hemodynamic of portal hipertension in the selection of patients for shunt surgery ". Ann. Surg., 176:449, 1972.
- 44.- CONN,H.O.; LINDENMUTH,W.W.:-" Prophylactic portacaval anastomosis in cirrhotic patients with esophageal varices ". New Eng. J. Med., 272:1255, 1965.
- 45.- JACKSON,F.C.; PERRIN,E.B.; SMITH,A.G.; DAGRADI,A.E.; NADAL,H.M.:-" A clinical investigation of the portacaval shunt. II. Survival analysis of the prophylactic operation ". Am.J.Surg., 115:22, 1968.
- 46.- JACKSON,F.C.; PERRIN,E.B.; FELX,W.R.; SMITH,A.G.:-" A clinical investigation of the portacaval shunt. V. Survival analysis of the therapeutic operation ". Ann. Surg. 177:673, 1971.
- 47.- WARREN,W.D.; ZEPPA,R.; FOMON,J.J.:-" Selective trans-splenic decompression of gastroesophageal varices by distal splenorenal shunt ". Ann. Surg., 166:437, 1967.
- 48.- WARREN,W.D.; SALAM,A.A.; FARALDO,A.; HUTSON,D.; SMITH,R.B.:-" End renal vein-to-splenic vein shunts for total or selective portal decompression ". Surgery, 72:995, 1972.
- 49.- BRITTON,R.C.; VOORHEES,A.B.Jr.; PRICE,J.B.:-" Selective portal decompression ". Surgery, 67:104, 1970.
- 50.- INOKUCHI,K.; KOBAYASHI,M.; OGAWA,Y.; SAKU,M.; INAKI,A.:-" Late results of a venous-caval shunt for esophageal varices . Analysis of 100 clinical cases ". Chir. Gastroent., 9:275, 1975.

- 51.- MORENO,E.; HIDALGO,M.; HEBRERO,J.; RUIZ,L.P.; JELAVIC,D.; SOLOZABAL,J.; SOLIS,J.; RAMIREZ,J.; ARIAS,E.; CASANOVA, A.:-" Anastomosis coronario-cava en el tratamiento de la hipertensión portal ". Rev. Clin. Esp., 141:565,1976.
- 52.- MORENO,E.; ARIAS,E.; HIDALGO,M.; HEBRERO,J.; PEREZ,A.; GARCIA OCANA,A.; CASANOVA,A.; ZUBICOA,A.:-" Indicaciones y resultados de la derivación coronario-cava distal selectiva en la hipertensión portal ". Rev. Esp. Enf. Ap. Digest., 49:1, 1977.
- 53.- DRAPANAS,T.:-" Interposition mesocaval shunt for treatment of portal hypertension ". Ann. Surg., 176:345, 1972.
- 54.- MORENO,E.; HIDALGO,M.; HEBRERO,J.; CALLE,A.; SOLOZABAL, J.; ZUBICOA,A.; SOLIS,J.; VALDIVIELSO,L.; RODRIGUEZ,J. L.; CASANOVA,A.; PEREZ MOTA,A.; GARCIA, I.:-" Anastomosis meso-cava en "H" mediante interposición de vena yugular interna autóloga ". Rev. Esp. Enf. Ap. Digest., 48:515, 1976.
- 55.- HASSAB.M.A.:-" Gastroesophageal decongestion and splenectomy in the treatment of esophageal varices in bilharzial cirrhosis: Further studies with a report on 355 operations ". Surgery, 61:169, 1967.
- 56.- SUGIURA,M.:-" A new technique for treating esophageal varices ". J. Thor. Cardiovasc. Surg.,66:677, 1973.
- 57.- MANN, F.C.; MAGATH,T.B.:-" The production of chronic liver insufficiency ". Am.J.Physiol., 59:485, 1922.

- 58.- MANN,F.C.:-" The portal circulation and restoration of the liver after partial removal ". Surgery, 8:225,1940.
- 59.- MANN,F.C.; FISHBACK,F.C.; GAY,J.C.; GREEN,G.F.:-" Experimental pathology of the liver. III. The effect of diverting the portal blood on the restoration of the liver after partial removal ". Arch. Path., 12:787,1931.
- 60.- STEPHENSON,G.W.:-" Experimental pathology of the liver. IX. Restoration of the liver following partial hepatectomy and partial ligation of the portal vein ". Arch. Path., 14:484, 1932.
- 61.- CHILD,C.G.III.; BARR,D.; HOLSWADE,G.R.; HARRISON,C.S.:  
-" Liver regeneration following portacaval transposition in dogs ". Ann. Surg., 138:600, 1953.
- 62.- FISHER,B.; RUSS,C.; UPDEGRAFF,H.; FISHER,E.R.:-" Effect of increased hepatic blood flow upon liver regeneration". A.M.A. Arch. Surg., 69:263,1954.
- 63.- FISHER,B.; SZUCH,P.; LEVINE,M.; FISHER,E.R.:-" A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration". Science , 171:575, 1971.
- 64.- FISHER,B.; SZUCH,P.; FISHER,E.R.:-" Evaluation of a humoral factor in liver regeneration utilizing liver trasplants ". Cancer Res., 31:322, 1971.
- 65.- WEXLER,M.J.; FARKOUH,E.F.; FARRER,P.A.; SLAPAK,M.; MacLEAN,L.D.:-" Auxiliary liver transplantation: A successful model without portal blood or portacaval shunt ". Ann. Surg., 175:357, 1972.



- 66.- VARAY,A.; MALLARME,J.:-" Hipersplenisme des cirrhosis ".  
Arch. Mal. App. Dig., 52:833, 1963.
- 67.- BUCHER,N.L.R.; MALT,R.A.:-" Regeneration of liver and  
kidney ". Boston. Little Brown and Co. 1971.
- 68.- HERRMANN,T.J.; TAYLOR,P.D.; MARCHIORO,T.L.; STARZL,T.E.  
:-" Oxygen and CO<sub>2</sub> content in the splanchnic and nons-  
planchnic blood of dogs with portacaval transposition ".  
Surgery, 60:1229, 1966.
- 69.- DRAPANAS,T.; KLUGE,D.N.; SCHENK,W.G.Jr.:-" Measurement  
of hepatic blood flow by bromsulphalein and by the  
electromagnetic flowmeter ". Surgery, 48:1017, 1960.
- 70.- KOCK,N.G.; HAHNLOSER,P.; RODING,B.; SCHENK,W.G.:-" In-  
teraction between portal venous and hepatic arterial  
blood flow: An experimental study in the dog ". Surgery,  
72:414, 1972.
- 71.- WARREN,W.D.; FOMON,J.J.; VIAMONTE,M.; MARTINEZ,L.O.;  
KALSER,M.:-" Spontaneous reversal of portal venous  
blood flow in cirrhosis ". Surg. Gynecol. Obstet., 126:  
315, 1968.
- 72.- WHIPPLE,A.O.:-" The rationale of portacaval anastomo-  
sis ". Bull. N.Y. Acad. Med., 22:251, 1946.
- 73.- BLAKEMORE,A.H.:-" Portacaval anastomosis: A report on  
fourteen cases ". Bull. N.Y. Acad. Med., 22:254, 1946.
- 74.- SILEN,W.; MAWDSLEY,D.L.; WEIRICH,N.L.; HARPER,H.A.:  
" Studies of hepatic function in dogs with Eck fistula  
or portacaval transposition ". Arch. Surg., 74:964,1957.

- 75.- ONO,H.; KOJIMA,Y.; ACKROYD,F.W.; HIPONA,F.A.; BROWN,H.;  
McDERMOTT,W.V.Jr.:-" Long-term results in portarenal  
transposition in dogs ". Surgery,64:214, 1968.
- 76.- ACKROYD,F.W.; MITO,M.; McDERMOTT,W.V.Jr.:-" Autonomic  
vasomotor controls in hepatic blood flow ". Am.J.Surg.,  
112:356, 1966.
- 77.- ADAMSON,R.J.; KINKHABWDA,M.; MOSKOWITZ,H.; HIMMELFARB,  
E.; MINKOWITZ,S.; LERNER,B.:-" Portacaval shunt with  
arterialization of the hepatic portion of the portal  
vein ". Surg. Gynecol. Obstet., 135:529, 1972.
- 78.- ZUIDEMA,G.D.; GAISFORD,W.D.; ABELL,M.R.; BRODY,T.M.;  
NEILL,S.; CHILD,C.G.:-" Segmental arterializarion of  
canine liver ". Surgery, 53:689, 1963.
- 79.- LECOMPTE,Y.; FRANCO,D.; MARTIN,E.D.; BISMUTH,H.:-"Li-  
ver arterialization with portacaval shunt in the  
cirrhotic rat ". Surgery, 75:161, 1974.
- 80.- FISHER,B.; RUSS,C.; UPDEGRAFF,H.:-" A suitable techni-  
que for total arterialization of the dog liver ". Sur-  
gery, 35:879, 1954.
- 81.- MCCREDIE,J.A.; DOGGART,J.R.; WELBOURN,R.B.:-" Total ar-  
terialization of the liver ". Br.J.Surg., 45:83, 1958.
- 82.- GRIFFEN, W.O.; BERNSTEIN,E.F.; NICHOLOFF,D.M.; MILLER,  
E.V.O.; ANDERSON,J.A.; WANGESTEEEN,O.H.:-" The effect  
of liver arterialization upon amonia clearence ". Surg.  
Gynecol. Obstet., 115:704, 1962.

- 83.- RATHER,L.J.; COHN,R.:-" Some effects upon the liver of complete arterialization of its blood supply. III. Acute vascular necrosis ". Surgery, 34:207, 1953.
- 84.- FISHER,B.; RUSS,C.; FEDOR,E.; WILDE,R.; ENGSTROM,P.; FISHER,E.R.:-" Further experimental observations on animals with arterialized livers ". Surgery, 38:181, 1955.
- 85.- FISHER,B.; FISHER,E.R.; LEE,S.:-" Experimental evaluation of liver atrophy and portacaval shunt ". Surg. Ginecol. Obstet., 125:1253, 1967.
- 86.- ROUS,P.; LARIMORE,L.D.:-" Relation of the portal blood to liver maintenance ". J.Exp.Med., 31:609, 1920.
- 87.- WEINBREN,K.; STIRLING,G.A.; WASHINGTON,S.L.A.:-" The development of a proliferative response in liver parenchyma deprived of portal blood flow ". Br. J. Exp. Pathol., 53:54, 1972.
- 88.- WEINBREN,K.; WASHINGTON,S.L.A.; SMITH,C.Y.:-" The response of the rat liver to alterations in total portal blood flow ". Br.J.Exp.Pathol., 56:148, 1975.
- 89.- LIEBERMAN,I.; SHORT,J.:-" Hepatic blood supply and control of deoxyribonucleic acid synthesis in liver ". Am.J.Physiol., 208:896, 1965.
- 90.- STARZL,T.E.; FRANCAVILLA,A.;MALGRIMSON,C.G.; FRANCAVILLA,R.S.; PORTER,K.A.; BROWN,T.H.; PUTNAM,C.W.:-" The origin hormonal nature and action of hepatotrophic substances in portal venous blood ". Surg. Ginecol. Obstet., 137:179, 1973.

- 91.- GARCIA ROMERO,E.; BELDA,R.; NAVARRO,F.; GARCIA GIL,J.M.; ARCELUS,I.M.:-" Anastomosis portocava en el perro con conservación del flujo procedente de la vena pancreática hacia el hígado ". Rev.Quir.Esp., 3:170, 1976.
- 92.- BOLLMAN,J.L.:-" The animal with an Eck fistula". Physiol. Rev., 41:607, 1961.
- 93.- MARCHIORO,T.L.; PORTER,K.A.; BROWN,B.I.; OTTE,J.B.; STARZL,T.E.:-" The effect of partial portacaval transposition on the canine liver ". Surgery,61:723, 1967.
- 94.- DEMPSTER,W.J.:-" Introduction to experimental surgical studies ". Springfield III; Charles C. Thomas, 1957.
- 95.- DUNPHY,J.E.; JACOB,S.:-" Significance of autologous organ transplantation in the approach to homotransplantation ". Ann. Surg., 151:760, 1960.
- 96.- SENEVIRATNE,R.D.:-" Transplantation of a lobe of the liver in the rat ". J.Path.Bact., 70:271, 1955.
- 97.- SIGEL,B.; POTASH,I.M.; MEDLIN,J.H.; WOLCOTT,M.W.:-"Autotransplantation of liver: Description of a method ". Surgery, 47:940, 1960.
- 98.- THORBJARNARSON,B.; McSHERRY,C.; RING,E.; FREY,C.; BEAL, J.M.:-" Autotransplantation of liver tissues ". Surgical Forum; Clinical Congress 1960, Vol. XI,p.20. Chicago. American College of Surgeons, 1960.
- 99.- SIGEL,B.; ACEVEDO,F.J.:-" Methods and results of partial liver autotransplantation ". Surg. Gynecol. Obstet., 114:731, 1962.

- 100.- SIGEL,B; BALDIA,L.; DUNN,M.R.:-" Studies of liver lobes autotransplanted outside the abdominal cavity". Surg.Gynecol.Obstet., 124:525, 1967.
- 101.- LEONG,G.F.; GRISHAM,J.W.; HOLE,B.V.; ALBRIGHT,M.I.:-" Effect of partial hepatectomy on DNA synthesis and mitosis in heterotopic partial autografts of rat liver ". Cancer Res., 24:1496, 1964.
- 102.- VIROLAINEM,M.:-" Mitotic response in liver autograft after partial hepatectomy in the rat." Exptl. Cell. Res., 35:588, 1964.
- 103.- PRICE,J.B.Jr.; VOORHEES,A.B.Jr.; BRITTON,R.C.:-" The role of portal blood in regeneration and function of completely revascularized partial hepatic autografts". Surgery, 62:195, 1967.
- 104.- WELCH,C.S.:-" A note on transplantation of the whole liver in dogs ". Transpl. Bull.,2:54, 1955.
- 105.- GOODRICH,E.O.; WELCH,H.F.; NELSON,J.A.; BEECHER,T.A.; WELCH,C.S.:-" Homotransplantation of the canine liver". Surgery, 39:244, 1956.
- 106.- STARZL,T.E.; MARCHIORO,T.L.; HUNTLEY,R.T.; RIFKIND,D.; ROWLANDS,D.T.Jr.;DICKINSON,T.C.; WADDELL,W.R.:-" Experimental and clinical homotransplantation of the liver ". Ann.N.Y. Acad. Sci., 120:739, 1964.
- 107.- STARZL,T.E.; MARCHIORO,T.L.; ROWLANDS,D.T.Jr.;KIRKPATRICK,C.H.; WILSON,W.C.; RIFKIND,D.; WADELL,W.R.:-" Immunosuppression after experimental and clinical homotransplantation of the liver ". Ann. Surg., 160: 411, 1964.

- 108.- MARCHIORO,T.L.; PORTER,K.A.; DICKINSON,T.C.;FARIS,T.D.;  
STARZL,T.E.:-" Physiologic requirements for auxiliary  
liver transplantation ". Surg. Gynecol. Obstet., 121:  
17, 1965.
- 109.- THOMFORD,N.R.; SHORTER,R.G.; HALLENBECK,G.A.:-" Homo-  
transplantation of the canine liver ". Arch. Surg., 90:  
527, 1965.
- 110.- CHRISTENSEN,B.G.; JACOBSEN,E.:-" Studies on liver re-  
generation ". Acta Med. Scand. 234 suppl.:103, 1949.
- 111.- BUCHER,N.L.R.; SCOTT,J.F.;AUB,J.C.:-" Regeneration of  
the liver in parabiotic rats ". Cancer Res.,11:457,  
1951.
- 112.- WENNEKER,A.S.; SUSSMAN,N.:-" Regeneration of liver  
tissue following partial hepatectomy in parabiotic  
rats ". Proc. Soc.Exp.Biol.N.Y., 76:683, 1951.
- 113.- ALLEGRI,A.; FORESTI,M.; RIZZOLINI,G.F.:-" La rigene-  
razione epatica nei ratti in parabiosi ". Arch. per le  
sc. med., 97:248, 1954.
- 114.- BRAUER,R.W.:-" Liver circulation and function ". Physiol  
Rev., 43:115, 1963.
- 115.- ROGERS,A.E.; SHAKA,J.A.; PECHET,G.; MacDONALD,R.A.:-"  
Regeneration of the liver. Absence of a humoral factor  
affecting hepatic regeneration in parabiotic rats ".  
Am.J.Path., 39:561, 1961.
- 116.- ISLAMI,A.H.; PACK,G.T.; HUBBARD,J.C.:-" The humoral  
factor in regeneration of the liver in parabiotic rats".  
Surg. Gynecol. Obstet., 109:549, 1959.

- 117.- BUNSTER,E.; MEYER,R.K.:-" An improved method of parabiosis ". Anat. Rec., 57:339, 1933.
- 118.-MOOLTEN,F.L.; BUCHER,N.L.R.:-" Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation". Science, 158:272, 1967.
- 119.- ALSTON,W.C.; THOMSON,R.Y.:-" Humoral and local factors in liver regeneration". Cancer Res.,23:901,1963.
- 120.- LEVI,J.U.; ZEPPA,R.:-" Source of the humoral factor that initiates hepatic regeneration ". Ann. Surg., 174:364, 1971.
- 121.-SAKAI,A.:-" Humoral factor triggering DNA synthesis after partial hepatectomy in the rat ". Nature, 228: 1186, 1970.
- 122.- WEINBREN,K.; WOODWARD,E.:-" Delayed incorporation of <sup>32</sup>P from orthophosphate into deoxyribonucleic acid of rat liver after subtotal hepatectomy ". Brit.J.Exp. Pathol., 45:442, 1964.
- 123.- LEVI,J.V.; ZEPPA,R.:-" The response of normal rat hepatocytes when exposed to humoral (regenerating) factor ". J.Surg.Res., 12:114, 1972.
- 124.- HARKNESS,R.D.:-" The spatial distribution of dividing cells in the liver of the rat after partial hepatectomy ".J.Physiol., 116:373, 1952.
- 125.- SIGEL,B.; BALDIA,L.B.; BRIGHTMAN,S.A.; DUNN,M.R.; PRICE,R.I.M.:-" The effect of blood flow reversal on the site of liver cell formation". Gastroenterology,52: 1142, 1967.

- 126.- BRUES,A.M.; DRURY,D.R.; BRUES,M.E.:-" A quantitative study of cell growth in regenerating liver ". Arch. Path., 22:658, 1936.
- 127.- BRUES,A.M.; MARBLE,B.B.:-" An analysis of mitosis in liver restoration ". J.Exper.Med., 65:15, 1937.
- 128.- GLINOS,A.D.; GEY,G.O.:-" Humoral factors involved in the induction of liver regeneration in the rat ". Proc. Soc.Exp.Biol.Med., 80:421, 1952.
- 129.- GENTILE,J.M.; GRACE,J.T.Jr.:-" A cell growth stimulating factor in partially hepatectomized rat serum ". Surg.Forum, 19:62, 1968.
- 130.- DEMETRIOU,A.A.; SEIFTER,E.; LEVENSON,S.M.:-" Effect of sera obtained from normal and partially hepatectomized rats and patients on the growth of cells in tissue culture ". Surgery, 76:779, 1974.
- 131.- PAUL,D.; LEFFERT,H.; SATO,G.; HOLLEY,R.W.:-" Stimulation of DNA and protein synthesis in fetal-rat liver cells by serum from partially hepatectomized rats ". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 69:374, 1972.
- 132.- SAKAI,A.; KOUNTZ,S.L.:-" Stimulation of hepatocytes and lymphocytes in vitro by liver regeneration ". Nature, 257:53, 1975.
- 133.- SMYTHE,R.L.; MOORE,R.O.:-" A study of possible humoral factors in liver regeneration in the rat ". Surgery, 44:561, 1958.
- 134.- UNGER,R.H.:-" Glucagon physiology and pathophysiology". New Engl.J.Med., 285:443, 1971.



- 135.- PRICE,J.B.Jr.; TAKESHIGE,K.;MAX,M.H.; VOORHEES,A.B.  
Jr.:-" Glucagon as the portal factor modifying hepatic regeneration ". Surgery, 72:74, 1972.
- 136.- PRICE,J.B.Jr.; TAKESHIGE,K.; PARSA,M.; VOORHEES,A.B.  
Jr.:-" Characteristics of animals maintained without splanchnic portal organs ". Surgery, 70:768, 1971.
- 137.- WHITTEMORE,A.D.; KASUYA,M.: VOORHEES,A.B.Jr.; PRICE,  
J.B.Jr.:w" Hepatic regeneration in the absence of portal viscera ". Surgery, 77:419, 1975.
- 138.- BUCHER,N.L.R.; SWAFFIELD,M.N.:-" Regeneration of liver in rats in the absence of portal splanchnic organs and a portal blood supply". Cancer Res.33:3189, 1973.
- 139.- GONZALEZ,E.M.; KREJCZY,K.; MALT,R.A.:-" Modification of nucleic acid synthesis in regenerating liver by azathioprine ". Surgery, 68:254, 1970.
- 140.- SUTHERLAND,E.W.; DE DUVE,C.:-" Origin and distribution of the hyperglycemic glucogenolytic factor of the pancreas ".J. Biol.Chem., 175:663, 1948.
- 141.- SAMOLS,E.; TYLER,J.; MEGYEST,C.; MARKS,V.:-" Immunochemical glucagon in human pancreas, gut and plasma ". Lancet, II:727, 1968.
- 142.- MAKMAN,M.H.; SUTHERLAND,E.W.:-" Use of liver adenyl cyclase for assay glucagon in human gastro-intestinal tract and pancreas ". Endocrinology, 75:127, 1964.

- 143.- OHNEDA,A.; PARADA,E.; EISENSTRANT,A.M.; UNGER,R.H.:  
" Characterization of response of circulating glucagon  
to intraduodenal and intravenous administration of  
aminoacids ". J.Clin.Invest., 47:2305, 1968.
- 144.- UNGER,R.H.; OHNEDA,A.; VALVERDE,I.; EISENTRAUT,A.;  
EXTON,J.:-" Characterization of the responses of cir-  
culating glucagon-like immunoreactivity to intraduo-  
denal and intravenous administration of glucose ". J.  
Clin.Invest., 47:48, 1968.
- 145.- VALVERDE,I.; RIGOPOULOU,D.; EXTON,J.; OHNEDA,A.;  
EISENTRAUT,A.; UNGER,R.H.:-" Demonstration and charac-  
terization of a second fraction of glucagon-like immu-  
noreactivity in jejunal extracts ". Am.J.Med.Sci.,  
225:415, 1968.
- 146.- SAID,S.I.; MUTT,V.:-" Polypeptide with broad biologi-  
cal activity: Isolation from small intestine ". Scien-  
ce, 169:1217, 1970.
- 147.- SAID,S.I.; MUTT,V.:-" Isolation from porcine-intestinal  
wall of a vasoactive octacosapeptide related to secre-  
tin and to glucagon. Eur.J.Biochem.,28:199, 1972.
- 148.- DESBUQUOIS,B.; LAUDAT,M.H.; LAUDAT,Ph.:-" Vasoactive  
intestinal polypeptide and glucagon: Stimulation of  
adenylate cyclase activity via distinct receptors in  
liver and fat cell membranes ". Biochem. Biophys.Res.  
Commn., 53:1187, 1973.

- 149.- STARZL,T.E.; PORTER,K.A.; KASHIWAGI,N.; LEE,I.Y.;  
RUSSELL,W.J.I.; PUTNAM,C.W.:-" The effect of diabetes  
mellitus on portal blood hepatotrophic factors in dogs".  
Surg.Gynecol.Obstet., 140:549, 1975.
- 150.- SAKAI,A.; TAHA,M.; KASHIWABARA,H.; PFEFFERMANN,R.;  
KOUNT,S.L.:-" On the origin of the regeneration factor".  
Surg.Gynecol.Obstet., 145:889, 1977.
- 151.- FISHER,B.; SZUCH,P.; LEVINE,M.; SAFFER,E.; FISHER,E.R.;  
-" The intestine as a source of a portal blood factor  
responsible for liver regeneration ". Surg.Gynecol.  
Obstet., 137:210, 1973.
- 152.- SUDILOVSKY,O.; PITOT,H.:-" Studies on the role of ade-  
nosine 3', 5' monophosphate during glucose repression  
in rat liver". Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,144:133, 1973.
- 153.- CHAMBERS,J.W.; GEORG,R.H.; BASS,A.D.:-" Effect of  
glucagon, cyclic 3',5'adenosine monophosphate and its  
dibutyryl derivative on amino acid uptake ". Endocri-  
nology, 87:366, 1970.
- 154.- TEWS,J.K.; WOODCOCK,N.A.; HARPER,A.E.:-" Stimulation of  
amino acid transport in rat liver slices by epine-  
phrine, glucagon and adenosine 3',5'monophosphate ".  
Chem., 245:3026, 1970.
- 155.- SUTHERLAND,E.W.; RALL,T.W.:-" The relation of adenosine  
3',5' monophosphate and phosphorylase to the actions  
of catecholamines and other hormones ". Pharmacol.Rev.  
12:265, 1960.

- 156.- RODBELL,M.:-" The problem of identifying the glucagon receptor ". Fed.Proc., 32:1854, 1973.
- 157.- LANGAN,T.A.:-" Phosphorylation of liver histone following the administration of glucagon and insulin ". Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 64:1276, 1969.
- 158.- LANGAN,T.A.:-" Histone phosphorylation: Stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate ". Science, 162:579, 1968.
- 159.- LANGAN,T.A.:-" Action of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent histone kinase in vivo ".J.Biol.Chem., 244: 5763, 1969.
- 160.- FRENSTER,J.H.; HERSTEIN,P.R.:-" Gene de-repression ". New.Engl. J.Med., 288:1224, 1973.
- 161.- ENEA,V.; ALLFREY,V.G.:-" Selective synthesis of liver nuclear acidic proteins following glucagon administration in vivo ". Nature, 242:265, 1973.
- 162.- KOTOULAS,O.B.; PHILLIPS,M.J.:-" Fine structural aspects of the mobilization of hepatic glucogen ". Am. J.Path., 63:1, 1971.
- 163.- CHIU,H.F.; PHILLIPS,M.J.:-" Induction of premature structural differentiation of fetal hepatocytes by glucagon". Gastroenterology, 65:533, 1973.
- 164.- MALAMUD,D.; PERRIN,L.:-" Stimulation of DNA synthesis in mouse pancreas by triiodothyronine and glucagon ". Endocrinology, 94:1157, 1974.

- 165.- SHORT,J.; BROWN,R.F.; HUSAKOVA,A.; GILBERSTON,J.R.; ZEMEL,R.; LIEBERMAN,I.:-" Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal ". J.Biol.Chem., 247:1757, 1972.
- 166.- SHELBURNE,J.D.; ARSTILA,A.U.; TUMP,Ph.; TRUMP,B.F.:-" Studies on cellular autophagocytosis: Cyclic AMP- and dibutyryl cyclic AMP-stimulated autophagy in rat liver". Am.J.Path., 72:521,1973.
- 167.- MIYAMOTO,M.; TERAYAMA,H.; OHNISHI,T.:-" Effects of protease inhibitors on liver regeneration ". Biochem. Biophys.Res.Comm., 55:533, 1973.
- 168.- POPPER,H.:-" Implications of portal hepatotrophic factors in hepatology ". Gastroenterology, 66:1227, 1974.
- 169.- STARZL,T.E.; PORTER,K.A.; KASHIWASI,N.; PUTNAM,C.W.:-" Portal hepatotrophic factors, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration ". Surg.Gynecol.Obstet., 141:843, 1975.
- 170.- STARZL,T.E.; LEE,I.Y.; PORTER,K.A.; PUTNAM,C.W.:-" The influence of portal blood upon lipid metabolism in normal and diabetic dogs and baboons ". Surg.Gynecol. Obstet., 140:381, 1975.
- 171.- POUYET,M.; BERARD,Ph.; RUCKEBUSCH,Y.:-" Derivations portohepatiques selectives. Origine pancreatique du facteur hepatropique portal". Ann.Cir., 23:293, 1969.
- 172.- STARZL,T.E.; PORTER,K.A.; WATANABE,K.; PUTNAM,C.W.:-" The effects of insulin, glucagon and insulin/glucagon infusions upon liver morphology and cell division after

- complete portacaval shunt in dogs ". Lancet, 2:821, 1976.
- 173.- STARZL,T.E.; PORTER,K.A.; PUTNAM,C.W.:-" Intraportal insulin protects from liver injury of portacaval shunt in dogs ". Lancet, 2:1241, 1975.
- 174.- BUCHER,N.L.R.; PATEL,U.; COHEN,S.:-" Hormonal factors concerned with liver regeneration ". Hepatotrophic Factors. CIBA Foundation Symposium, 55:98, 1978.
- 175.- LIEBERMAN,I.; OVE,P.:-" Growth factors for mammalian cells in culture ". J.Biol.Chem. 234:2754, 1959.
- 176.- LEFFERT,H.L.:-" Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. VII. Hormonal control of DNA synthesis and its possible significance to the problem of liver regeneration ". J. Cell. Biol. , 62:792, 1974.
- 177.- RICHMAN,R.A.; CLAUS,T.H.; PLIKIS,S.J.; FRIEDMAN, D.L.:-" Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat liver ". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 73:3589, 1976.
- 178.- YOUNGER,L.R.; KING,J.; STEINER,D.F.:-" Hepatic proliferative response to insulin in severe alloxan diabetes ". Cancer Res., 26:1408, 1966.
- 179.- CUATROCASAS,P.:-" Properties of the insulin receptor of isolated fat cell membranes". J.Biol.Chem.,246:7265, 1971.

- 180.- CUATRECASAS,P.:-" Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: Direct measurement and properties ". Proc.Natl. Acad.Sci. USA, 68:1264, 1971.
- 181.- CUATRECASAS,P.:-" Insulin recetor of liver and fat cell membranes ". Fed.Proc., 32:1838, 1973.
- 182.- HADDEN,J.W.; HADDEN,R.M.; HADDOX,M.K.; GOLDBERG,N.D.:-" Guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate: A possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes ". Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 69:3024, 1972.
- 183.- GOLDBERG,N.D.; VILLAR-PALASI,C.; SASKO,H.:-" Effects on insulin treatment on muscle 3'5 cyclic adenylate levels in vivo and in vitro ". Biochim.Biophys.Acta, 148:665, 1967.
- 184.- CUATRECASAS,P.; ILLIANO,G.:-" Modulation of adenylate cyclase activity in liver and fat cell membranes by insulin ". Science, 175:906, 1972.
- 185.- JEFFERSON,L.S.; EXTON,J.H.; BUTCHER,R.W.; SUTHERLAND,E.W.; PARK,C.R.:-" Role of adenosine 3',5'monophosphate in the effects of insulin and anti-insulin serum on liver metabolism ".J. Biol.Chem., 243:1031, 1968.
- 186.- STARZL,T.E.; PORTER,K.A.; FRANCAVILLA,J.A.; BENICHO,J.; PUTNAM,C.W.:-" A hundred years of the hepatotropic controversy ". Hepatotrophic Factors. CIBA Foundation Symposium, 55:127, 1978.

- 187.- MANGANIELLO,V.C.; MURARD,F.; VAUGHN,M.:-" Effects of lipolytic and antilipolytic agents on cyclic 3',5' adenosine monophosphate in fat cells ".J.Biol.Chem., 246:2195, 1971.
- 188.- HONJO,I.; OZAWA,K.:-" Presence of a mitochondria-stimulating factor (MSF) in portal blood: Its relation to regeneration and atrophy ". In the working session of 9th international Congress of Gastroenterology,Paris, 1972.
- 189.- OZAWA,K.; KITAMURA,G.; YAMAOKA,O.; MIZUKAMI,T.; KAMANO,T.; TAKEDA,H.; TAKASAN,H.; HONJO,I.:-" Relation of phosphorylative capacity of liver mitochondria to cytochrome a (+a<sub>3</sub>) content ". Am.J.Surg., 127:306, 1974.
- 190.- BOIME,I.; SMITH,E.E.; HUNTER,F.E.:-" Stability of oxidative phosphorylation and structural changes of mitochondria in ischemic rat liver ". Arch.Biochem.Biophys. 128:704, 1968.
- 191.- FARKOUH,E.P.; DANIEL,A.M.; BEAUDOIN,J.; MACLEAN,L.D.:-" Predictive value of liver biochemistry in acute hepatic ischemia ". Surg.Gynecol.Obstet., 132:832, 1971.
- 192.- OZAWA,K.; SETA,K.; ARAKI,H.; HANDA,H.:-" The effect of ischemia on mitochondrial metabolism ". J. Biochem. 61:512, 1967.
- 193.- OZAWA,K.; TAKASAN,H.; KITAMURA,O.; MIZUKAMI,T.; KAMANO,T.; TAKEDE,H.; OHSAWA,T.; MURATA,T.; HONJO,I.:-" Effect of ligation of portal vein on liver mitochondrial metabolism ".J.Biochem., 70:755, 1971.



- 194.- OZAWA,K.; KITAMURA,O.; YAMAOKA,Y.; MIZUKAMI,T.; KAMANO,  
T.; TAKEDA,H.; TAKASAN,H.; HONJO,I.:-" Role of portal  
blood on the enhancement of liver mitochondrial meta-  
bolism ". Am.J. Surg., 124:16, 1972.
- 195.- OZAWA,K.; YAMADA,T.; HONJO,I.:-" Role of insulin as a  
portal factor in maintaining the viability of liver ".  
Ann.Surg., 180:716, 1974.
- 196.- OZAWA,K.; KAMAOKA,Y.; NANBU,H.; HONJO,I.:-" Insulin as  
the primary factor governing changes of mitochondrial  
metabolism leading to liver regeneration and atrophy ".  
Am.J.Surg., 127:669, 1974.
- 197.- TATA,J.R.:-" The regulation of mitochondrial structu-  
re and function by thyroid hormones under physiologi-  
cal conditions ". Regulation of Metabolic Processes  
in Mitochondria. J.M. Tager, S.Papa,E.Quagliarielle  
and E.C. Slater, Editors. Elsevier, 489, 1966.
- 198.- CATER,D.B.; HOLMES,B.E.; MEE,L.K.:-" The effect of  
growth hormone upon cell division and nucleic acid  
synthesis in the regenerating liver of the rat ".Biochem.  
J.; 66:482, 1957.
- 199.- HEMINGWAY,J.T.; CATER,D.B.:-" Effects of pituitary  
hormones and cortisone upon liver regeneration in the  
hypophysectomized rat ". Nature,181:1065, 1958.
- 200.- SNYDER,S.H.; RUSSELL,D.H.:-" Polyamine synthesis in  
rapidly growing tissuer ".Fed.Proc.,29:1575, 1970.

- 201.- SHORT,J.; TSUKADA,K.; RUDERT,W.A.; LIEBERMAN,I.:  
" Cyclic adenosine 3',5'monophosphate and the induction  
of deoxyribonucleic acid synthesis in liver ". J. Biol.  
Chem, 250:3602, 1975.
- 202.- LEFFERT,H.; ALEXANDER,N.M.; FALCONA,G.; RUBALCAVA,B.;  
UNGER,R.:-" Specific endocrine and hormonal receptor  
changes associated with liver regeneration in adult  
rats ". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72:4033, 1975.
- 203.- TELL,G.P.E.; CUATRECASAS,P.:-" Somatomedin: inhibition  
of adenylate cyclase activity in subcellular membra-  
nes of various tissues ".Science, 180:312, 1973.
- 204.- JAKOB,A.; HAURI,Ch.; FROESH,E.R.:-" Nonsuppressible  
insulin-like activity in human serum.III.Differentia-  
tion of two distinct molecules with nonsuppressible ILA".  
J.Clin,Invest., 47:2678, 1968.
- 205.- CASH,W.D.; KAPLAN,M.H.:-" A comparison of the effects  
of 8-lysine-vasopressin, 1-deamino-8-lysine-vasopres-  
sin and 1-acetyl-8-lysine-vasopressine on the blood  
glucose level in rabbits ". Endocrinology, 74:803,1964.
- 206.- BALASSE,E.; RASIO,E.; CONARD,V.:-" Action insulinomi-  
etique de la vasopressine chez le chien ". Arch.  
Int.Pharmacodyn., 161:392, 1966.
- 207.- DAUGHADAY,W.H.; HALL,K.; RABEN,M.S.; SALMON,W.D.Jr.;  
VAN DEN BRANDE,J.L.; VAN WYK,J.J.:-" Somatomedin: Pro-  
posed designation for sulphation factor ". Nature, 235:  
107, 1972.

- 208.- VAN WYK,J.J.; HALL.; VAN DER BRANDE,J.L.; WEABER,R.P.:  
" Further purification and characterization of sul-  
phation factor and thymidine factor from acromegalic  
plasma ".J.Clin. Endocrinol.Metab., 32:389, 1971.
- 209.- COHEN,S.; CARPENTIER,G.; LEMBACH,K.J.:-" Interaction  
of epidermal growth factor with cultured fibroblast ".  
Adv.Metab.Disord., 8:265, 1975.
- 210.- GOSPODAROWICZ,D.; MORAN,J.S.:-" Growth factors in ma-  
mmalian cell culture ".Annu.Rev.Biochem., 45:531, 1976.
- 211.- BRAZEAU,P.; VALE,M.; BURGUN,R.; LING,N.; BUTCHER,M.;  
RIVIER,J.; GUILLEMIN,R.:-" Hypotalamic polypeptide  
that inhibits the secretion of immunoreactive pitui-  
tary growth hormone ". Science, 179:77, 1973.
- 212.- GOLDSMITH,P.C.; ROSE,J.C.; ARIMURA,A.; GANONG,W.F.:  
" Ultrastructural localization of somatostatin in pan-  
creatic islets of the rat ". Endocrinology, 97:1061,  
1973.
- 213.- OLIVER,J.R.; LONG,K.; WAGLE,S.R.; ALLEN,D.O.:-" Somatos-  
tatin inhibition of glucagon-stimulated adenosine 3',5'<sup>i</sup>  
monophosphate accumulation in isolated hepatocytes ".  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 153:367, 1976.
- 214.- CREAN,G.P.; MARSHALL,M.W.; RUMSEY,R.D.E.:-" Parietal  
cell hyperplasia induced by the administration of pen-  
tagastrin (ICI 50, 123) to rats ". Gastroenterology,  
57:147, 1969.

- 215.- THOMPSON,W.J.; WILLIAMS,R.H.; LITTLE,S.A.:-" Activation of guanylcyclase and adenylyl cyclase by secretin ". Biochim.Biophys. Acta, 302:329, 1973.
- 216.- ORLOFF,M.J.; LEE,S.; CHARTERS,A.C.; CHANDLER,J.G.; SGRO,J.C.; GRAMBORT,D.E.; BROELSCH,C.E.:-" Site of origin of the hepatotrophic portal blood factor responsible for liver regeneration ". Gastroenterology, 66:755, 1974.
- 217.- SAKAI,A.; PFEFFERMANN,R.; KOUNTZ,S.L.:-" Liver regeneration and lymphocyte activation ".Surg.Gynecol.Obstet., 143:914, 1976.
- 218.- PRICE,J.B.Jr.:-" Insulin and glucagon as modifiers of DNA synthesis in the regenerating rat liver ". Metabolism, 25:1427 suppl., 1976.
- 219.- STARLZ,T.E.; PORTER,K.A.; PUTNAM,C.W.:-" Insulin, glucagon and the control of hepatic structure, function and capacity for regeneration ". Metabolism, 25:1429 suppl. 1976.
- 220.- PEREZ TAMAYO,T.; ROMERO,R.:-" Role of the spleen in regeneration of the liver as experimental study ". Lab. Invest., 7:248, 1958.
- 221.- BUCHER,N.L.R.; SWAFFIELD,M.N.:-" Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon ". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72:1157, 1975.

- 222.- FARIVAR,M.; WANDS,J.R.; ISSELBACHER,K.J.; BUCHER,N.L.R.-  
" Beneficial effect of insulin and glucagon in fulmi-  
nant murine viral hepatitis ".Lancet, I:696, 1976.
- 223.- BUCHER,N.L.R.; WEIR,G.C.:-" Insulin, glucagon, liver  
regeneration and DNA synthesis ". Metabolism, 25:1423  
suppl., 1976.
- 224.- UNGER,R.H.:-" Glucagon and the insulin: glucagon molar  
ratio in diabetes and other catabolic diseases ".  
Diabetes, 20:834, 1971.
- 225.- ROCHA,D.M.; SANTEUSANIO,F.; FALOONA,G.R.; UNGER,R.H.:  
" Abnormal pancreatic alpha-cell function in bacterial  
infections ". New Engl.J.Med., 288:700, 1973.
- 226.- GERICH,J.E.; KARAM,J.H.; FORSHAM,P.H.:-" Reciprocal  
adrenergic control of pancreatic alpha-and beta-cell  
function in man ". Diabetes suppl., 1:332, 1972.
- 227.- GERICH,J.E.:-" Control of pancreatic IRG secretion in  
vivo ". Metabolism suppl., 25:1437, 1976.
- 228.- SAKAMOTO,Y.; JEHN,D.; NICOLSON,M.O.; OHASHI,E.; HAYS,  
D.M.:-" The acceleration of hepatic regeneration by  
prior laparatomy ".J.Surg.Res., 23:306, 1977.
- 229.- SERA,Y.; SAKAMOTO,Y.; KOGA,Y.; HAYS,D.M.:-" Liver re-  
generation: cultural characteristics of remnant liver  
cells following a second partial hepatectomy ". Expe-  
rientia, 33:194, 1977.
- 230.- CHANUTIN,A.; HORSTENSTEIN,J.C.; COLE,W.S.; LUDEWIG,S.:  
" Blood plasma proteins in rats following partial hepa-  
tectomy and laparotomy ".J.Biol.Chem.,123:247, 1938.

- 231.- MADDEN,S.C.; WHIPPLE,G.H.:-" Plasma proteins: their source, production and utilization ". *Physiol.Rev.*, 20:194, 1940.
- 232.- MUNRO,M.P.; AVERY,A.:-" Influence of hepatectomy on relative concentrations of proteins components of dog plasma as determinated by electrophoresis. *Am.J.Physiol.* 146:673, 1946.
- 233.- ROBERTS,S.; WHITE,A.:-" Studies on the origin of the serum proteins ".*J.Biol.Chem.*, 180:505, 1949.
- 234.- BRAUN,G.A.; MARSH,J.B.; DRABKIN,D.L.:-" Synthesis of plasma albumin and tissue proteins in regenerating liver ". *Metabolism*, 11:957, 1962.
- 235.- OPPENHEIMER,M.J.; FLOCK,E.V.:-" Alkaline phosphatase levels in plasma and liver following partial hepatectomy ". *Am.J.Physiol.*, 149:418, 1947.
- 236.- WEINBREN,K.; BILLING,B.H.:-" Hepatic clearance of bilirubin as an index of cellular function in the regenerating rat liver ". *Brit.J.Exp.Path.*, 37:199, 1956.
- 237.- VAN LANCKER,J.L.:-" Molecular and cellular mechanisms in disease ". *Edit.Springer Verlag*, 898, 1976.
- 238.- BECKER,F.:-" Restoration of liver mass following partial hepatectomy: Surgical Hepartrophy.I. Influence of blood flow ". *Am.J.Path.*, 43:497, 1963.
- 239.- HARKNESS,R.D.:-" Changes in the liver of the rat after partial hepatectomy ".*J.Physiol.*, 117:267, 1952.

- 240.- TAKATSUDA,Y.; KOHNO,M.; HIGASHI,K.; HIRANO,H.; SAKA-MOTO,Y.:-" Redistribution of chromatin containing ribosomal cistrons during liver regeneration ". Exp. Cell Res., 103:191, 1976.
- 241.- UNUMA,T.; MORRIS,H.P.; BUSCH,H.:-" Comparative studies of the nucleoli of Morris hepatomas, embryonic liver, and aflatoxin B<sub>1</sub>-treated liver of rats ". Cancer Res., 27:2221, 1967.
- 242.- TSUKADA,K.; LIEBERMAN,I.:-" Metabolism of nucleolar ribonucleic acid after partial hepatectomy ". J. Biol. Chem., 239:1564, 1964.
- 243.- STOWELL,R.E.:-" Alterations in nucleic acids during hepatoma formation in rats fed p-dimethylaminoazobenzene ". Cancer , 2:121, 1949.
- 244.- BECKER,F.E.; LANE,B.P.:-" Regeneration of the mammalian liver.IV. Evidence on the role of cytoplasmic alterations in preparation for mitosis ". Am.J.Path., 49:227, 1966.
- 245.- POPPER,H.; SCHAFFNER,F.:-" Progresos en patología hepática ". Vol. III. Edit. Científico-Médica, 1972.
- 246.- NOVIKOFF,A.B.; POTTER,V.R.:-" Biochemical studies on regenerating liver ". J.Biol.Chem., 173:223, 1948.
- 247.- LANE,B.P.; BECKER,F.F.:-" Regeneration of the mammalian liver. V. Mitotic division in cytologically differentiated liver ". Am.J.Path., 50:435, 1967.

- 248.- HAM,A.W.:-" Tratado de Histología ". Edit. Interamericana, pág. 97, 1970.
- 249.- STONELL,R.E.:-" Nucleic acids and cytologic changes in regenerating rat liver ".Arch.Path., 46:164, 1948.
- 250.- ORTEGA,P.:-" Partial hepatectomy in rats fed dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT) ". Am.J.Path., 56:229, 1959.
- 251.- FEX,G.; OLIVECRONA,T.:-" The metabolism of (<sup>3</sup>H) oleic acid in the partially hepatectomized rat ". Biochim. Biophys.Acta, 152:237, 1968.
- 252.- GLENDE,E.A.Jr.; MORGAN,W.S.:-" Alteration in liver lipid and lipid fatty acid composition after partial hepatectomy in the rat ". Exp.Molec.Path., 8:190, 1968.
- 253.- BECKER,F.F.; LANE,B.P.:-" Regeneration of the mammalian liver. I. Auto-phagocytosis during dedifferentiation of the liver cell in preparation for cell division ". Am.J.Path., 47:483, 1965.
- 254.- ALLARD,C.; DE LAMIRANDE,G.; CANTERO,A.:-" Mitochondrial population of mammalian cells. II. Variations in the mitochondrial population of the average rat liver cell during regeneration. Use of the mitochondrion as a unit of measurement ". Cancer Res., 12:580, 1952.
- 255.- DAVIS,J.M.G.:-" Ultrastructure of rat liver cell cytoplasm during the process of regeneration after partial hepatectomy ". Acta Radiol., 58:17, 1962.



- 256.- BUCHER,N.L.R.:-" Experimental aspects of hepatic regeneration ". New Engl.J.Med., 277:686, 1967.
- 257.- JAFFE,J.J.:-" Diurnal mitotic periodicity in regenerating rat liver ". Anat.Rec., 120:935, 1954.
- 258.- BARBIROLI,B.; POTTER,V.R.:-" DNA synthesis and interaction between controlled feeding schedules and partial hepatectomy in rats ". Science, 172:738, 1971.
- 259.- JACKSON,B.:-" Time-associated variations of mitotic activity in livers of young rats ". Anat.Rec.,134:365, 1959.
- 260.- HALBERG,F.; BARNUM,C.P.; SILBER,R.H.; BITTNER,J.J.:-" 24-hour rhythm at several levels of integration in mice on different lighting regimens". Proc.Soc.Exp. Biol.Med., 97:897, 1958.
- 261.- BARNUM,C.P.:-" Nucleic acid synthesis in regenerating liver ". Texas Rep.Biol.Med., 15:134, 1957.
- 262.- BLUMENFELD,C.M.:-" Normal an abnormal mitotic activity. I. Comparison of periodic mitotic activity in epidermis,renal cortex, and submaxillary gland of the albino rat ".Arch.Path., 33:770, 1942.
- 263.- RABES,H.M.; WIRSCHING,R.; TUCZEK,H.V.; ISELER,G.:-" Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy ". Cell.Tissue.Kinet., 9:517,1976.
- 264.- VAN LANCKER,J.L.; SEMPOUX,D.G.:-" Incorporation of orotic acid-C<sup>14</sup> in rat liver DNA after partial hepatectomy of one partner of a parabiotic pair".Arch.Biochem.Biophys., 80:337, 1959.

- 265.- SCORNIK,O.A.:-" In vivo rate of translation by ribosomes of normal and regenerating liver ". J. Biol. Chem, 249:3876, 1974.
- 266-ANDERSON,W.M.; GRUNDHOLM,A.; SELLS,B.H.:-" Modification of ribosomal proteins during liver regeneration ". Biochem.Biophys.Res.Comm., 62:669, 1975.
- 267.- FUJIOKA,M.; KOGA,M.; LIEBERMAN,I.:-" Metabolism of ribonucleic acid after partial hepatectomy ".J.Biol. Chem., 238:3401, 1963.
- 268.- BAILEY,R.P.; RUDERT,W.A.; SHORT,J.; LIEBERMAN,I.:-" Nucleolar changes in liver before the onset of deoxyribonucleic acid replication ". J.Biol.Chem., 250:4305, 1975.
- 269.- KRISHNA,G.; HARWOOD,J.P.; BARKER,A.J.; JAMIESON,G.A.:-" Requirement for guanosine triphosphate in the prostaglandin activation of adenylate cyclase of platelet membranes ".J.Biol.Chem., 247:2253, 1972.
- 270.- FAUSTO,N.; VAN LANCKER,J.L.:-" Molecular mechanism of liver regeneration.VI. Incorporation of (<sup>14</sup>C) orotic acid into cytoplasmic RNA in normal and regenerating liver ". Biochim.Biophys. Acta, 161:32, 1968.
- 271.- BUSCH,S.; CHAMBON,P.; MANDEL,P.; WEILL,J.D.:-" The effect of partial hepatectomy on the ribonucleic acid polymerase of rat liver ". Biochem.Biophys.Res.Comm., 7:255, 1962.
- 272.- RO,T.S.; BUSH,H.:-" Studies on RNA polymerase of nuclear fractionsof regenerating liver ". Biochim. Biophys.Acta, 134:184, 1967.

- 273.- LORUP,C.:-" Nuclear and cytoplasmic RNase-activity in regenerating mouse liver ". Virchows Arch.B.Cell Path., 24:41, 1977.
- 274.- CHURCH,R.; MCCARTHY,B.J.:-" Changes in nuclear and cytoplasmic RNA in regenerating mouse liver ". Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 58:1548, 1967.
- 275.- GREENE,R.F.; FAUSTO,N.:-" Analysis of gene expression in regenerating rat liver by hybridization of nuclear and cytoplasmic RNA with DNA ". Cancer Res.,37:118, 1977.
- 276.- PÖSÖ,H.; JÄNNE,J.:-" Inhibition of polyamine accumulation and deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver ". Biochem.J., 158:485, 1976.
- 277.- NYGAARD,O.; RUSCH,H.P.:-" Incorporation of radioactive phosphate into nucleic acids of regenerating rat liver ". Cancer Res., 15:240, 1955.
- 278.- BECKER,F.F.:-" Humoral aspects of liver regeneration". Humoral control of growth and differentiation ". Eds.Lobue.J. and G.A.S. (Academic Press, New York), I:249, 1973.
- 279.- HECH,L.I.; POTTER,V.R.:-" Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver; rate of deoxyribonucleic acid synthesis in vivo ". Cancer Res., 16:988, 1956.
- 280.- SHORT,J.; ARMSTRONG,N.B.; ZEMEL,R.; LIEBERMAN,I.:-" A role for amino acids in the induction of deoxyribonucleic acid synthesis in liver ". Biochem.Biophys. Res.Comm., 50:430, 1973.

- 281.- SHORT,J.; ARMSTRONG,N.B.; KOLITSKY,M.A.; MITCHELL, .  
R.A.; ZEMEL,R.; LIEBERMAN,I.:-" Control of prolifera-  
tion in animal cells (Clarson, B. and Baserga,R.  
Eds.) 37-48. Cold spring Harbor Laboratory, Cold  
spring Harbor, New York, 1974.
- 282.- HARRIS,H.; SIDEBOTTOM,E.; GRACE,D.M.; BRAMVELL,M.E.:  
" The expression of genetic information: a study  
with hybrid animal cell ". J.Cell.Sci., 4:499, 1969.
- 283.- DEAK,I.; SIDEBOTTOM,E.; HARRIS,H.:-" Further expe-  
riments on the role of the nucleolus in the expres-  
sion of structural genes ". J.Cell.Sci., 11:379,1972.
- 284.- RELYEA,N.; RANDO,R.R.:-" Potent inhibition of orni-  
thine decarboxylase by B,Y unsaturated substrate ana-  
logs ". Biochem.Biophys.Res.Comm., 67:392, 1975.
- 285.- KAY,J.E.; PEGG,A.E.:-" Effect of inhibition of sper-  
midine formation on protein and nucleic and synthe-  
sis during lymphocyte activacion". FEBS Lett., 29:  
301, 1973.
- 286.- KREMZNER,L.T.:-" Polyamines. Introductory remarks."  
Pharmacology Society Symposium Fed.Proc., 29:1560,  
1970.
- 287.- TABOR,H.; TABOR,C.W.:-" Spermidine, spermine, and  
related amines ". Pharmacol. Rev.,16:245, 1964.
- 288.- DYKSTRA,W.G.Jr.; HERBST,E.J.:-" Spermidine in rege-  
nerating liver. Relation to rapid synthesis of ribo-  
nucleic acid ".Science, 149:425, 1965.

- 289.- JÄNNE,J.:-" Studies on the biosynthetic pathway of poliamines in rat liver ". Acta Physiol.Scand.suppl. 300:1, 1967.
- 290.- RAINA,A.; TELARANTA,T.:-" Association of polyamines and RNA in isolated subcellular particles from rat liver ". Biochim.Biophys. Acta, 138:200, 1967.
- 291.- JÄNNE,J.; RAINA,A.:-" Stimulation of spermidine synthesis in the regenerating rat liver: relation to increased ornithine decarboxylase activity ". Acta Chem.Scand., 22:1349, 1968.
- 292.- RUSSELL,D.H.; SNYDER,S.H.; MEDINA,V.J.:-" Presence and biosynthesis of putrescine and polyamines in amphibians ". Life Sci., 8:1247, 1969.
- 293.- KAHLSON,G.; ROSENGREN,E.:-" New approaches to the physiology of histamine ".Physiol.Rev.,48:155, 1968.
- 294.- RUSSELL,D.H.; SNYDER,S.H.:-" Amyne synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors ".Proc.Natl.Acad.Sci.USA,60:1420,1968.
- 295.- KOSTYO,J.L.:-" Changes in polyamine content of rat liver following hypophysectomy and treatment with growth hormone ".Biochem.Biophys.Res.Comm.,23: 150, 1966.
- 296.- JÄNNE,J.; RAINA,A.:-" On the stimulation of ornithine decarboxylase and RNA polymerasa activity in rat liver after treatment with growth hormone". Biochim. Biophys.Acta, 174:769, 1969.

- 297.- RAINA,A.; JÄNNE,J.-" Polyamines and the accumulation of RNA in mammalian systems ".Fed.Proc., 29: 1568, 1970.
- 298.- BULLOUGH,W.S.:-" Epitelial repair, in repair and regeneration ". The scientific basis for surgical practice. (Dunphy J.E. and Van Winkle,W.Jr., Eds) Mc. Graw-Hill book company: 35, 1969.
- 299.- BULLOUGH ,W.S.:-" Agings of mammals ".Nature,229: 608, 1971.
- 300.- BULLOUGH,W.S.; LAURENCE,E.B.:-" Chalone and cancer". Nature, 220:134, 1968.
- 301.- SAETREN,H.:-" A principle of auto-regulation of growth ". Exp.Cell.Res., 11:229, 1956.
- 302.- VERLY,W.G.; DESCHAMPS,Y.; PUSHPATHADAM,J.; DESROSIERS, M.:-" The hepatic clahone. I. Assay method for the hormone and purification of the rabbit liver chalone ". Can.J.Biochem., 49:1376, 1971.
- 303.- SIMARD,A.; CORNEILLE,L.; DESCHAMPS,V.; VERLY,W.G.:-" Inhibition of cell proliferation in the livers of hepatectomized rats by a rabbit hepatic clahone ". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 71:1763, 1974.
- 304.- BURGER,M.M.:-" Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth". Nature, 227:170, 1970.

- 305.- CLARKE,G.D.; STOKER,M.G.P.; LUDLOW,A.; THORNTON,M.:  
" Requirement of serum for DNA synthesis in BHK 21  
cells: Effects of density,suspension and virus trans-  
formation ". Nature, 227:798, 1970.
- 306.- GURNEY,T.Jr.:-" Local stimulation of growth in pri-  
mary cultures of chick embryo fibroblasts ". Proc.  
Natl.Acad.Sci.USA, 62:906, 1969.
- 307.- YAMAMOTO,K.; OMATA,S.; OHNISHI,T.; TERAYAMA,H.:  
" In vivo effects of proteaseson cell proliferation  
in the liver ". Cancer Res., 33:657, 1973.
- 308.- KLINGENBERG,M.:-" Pigments of rat liver microsomes".  
Arch. Biochem.Biophys., 75:376, 1958.
- 309.- GARFINKEL,D.:-" Studies on pig liver microsomes. I.  
Enzymic and pigment composition of different micro-  
somal fractions ". Arch.Biochem.Biophys.,77:493,  
1958.
- 310.- OMURA,T.; SATO,R.:-" The carbon monoxide-binding  
pigment of liver microsomes. I. Evidence for its he-  
moprotein nature ". J.Biol.Chem.,239:2370, 1964.
- 311.- CONNEY,A.H.:-" Enzyme induction and drug toxicity ".  
Proceedings of the second International Pharmacology  
Meeting, 4:277, 1965.
- 312.- GAUDETTE,L.E.; BRODIE,B.B.:-" Relationship between  
lipid solubility of drugs and their oxidation by li-  
ver microsomes ".Biochem.Pharmacol.,2:89, 1959.

- 313.- OMURA,T.; SATO,R.-" The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties ". J.Biol.Chem.,239: 2379, 1964.
- 314.- ESTABROOK,R.W.; SHIGAMATZU,A.; SCHENKMAN,J.B.:  
" The contribution of the microsomal electron transport pathway to the oxidative metabolism of liver ". Advances Enzym.Regulat., 8:121, 1970.
- 315.- REMMER,H.:-" The role of the liver in drug metabolism " Am.J.Med., 49:617, 1970.
- 316.- DAVIES,D.S.; THORGEIRSSON,S.S.:-" Mechanism of hepatic drug oxidation and its relationship to individual differences in rates of oxidation in man ". Ann. N.Y.Acad.Sci., 179:411, 1971.
- 317.- ESTABROOK,R.W.; FRANKLIN,M.R.; COHEN,B.; SHIGAMATZU, A.; HIDEBRANT,A.G.:-" Biochemical and genetic factors influencing drug metabolism. Influence of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions on cellular metabolic control ". Metabolism, 20: 187, 1971.
- 318.- KASPER,C.B.:-" Biochemical distinctions between the nuclear and microsomal membranes from rat hepatocytes ".J.Biol.Chem., 246:577, 1971.
- 319.- BEREZNEY,R.; CRANE,F.L.:-" Cytochromes in bovine liver nuclear membranes ". Biochem.Biophys.Res.Comm., 43:1017, 1971.



- 320.- FLEISCHER, S.; FLEISCHER, B.; AZZI, A.; CHANCE, B.:  
" Cytocrome B<sub>5</sub> and P<sub>450</sub> in liver cell fractions ".  
Biochim.Biophys.Acta, 225:194, 1971.
- 321.- GARFINKEL, D.: " A comparative study of electron trans-  
port in microsomes ". Comp.Biochem.Physiol., 8:367,  
1963.
- 322.- APPLEBY, C.A.: " A soluble haemoprotein P-450 from  
nitrogen-fixing *Rizobium Bacterioides* ". Biochim.  
Biophys.Acta, 147:399, 1967.
- 323.- KATAGIRI, M.; GANGULI, B.N.; GUNSALUS, I.C.: " A solu-  
ble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxi-  
lation ". J.Biol.Chem., 243:3543, 1968.
- 324.- POPPER, H.; SCHAFFNER, F.: " Progresos en Patología He-  
pática ". Vol.IV, Edit.Científico-Médica, 1972.
- 325.- SCHENKMAN, J.B.; FREY, I.; REMMER, H.; ESTABROOK, R.W.:  
" Sex differences in drug metabolism by rat liver mi-  
crosomes ". Molec.Pharmacol., 3:516, 1967.
- 326.- IMAI, Y.; SATO, R.: " Studies on the substrate inter-  
action with P-450 in drug hidroxilation by liver mi-  
crosomes ". J.Biochem., 62:239, 1967.
- 327.- DIEHL, H.; SCHADELIN, J.; ULLRICH, V.: " Studies on the  
kinetics on cytochrome P-450 reduction in rat liver  
microsomes ". Hoppe. Seyler.Z.Physiol.Chem., 351:  
1359, 1970.
- 328.- ORRENIUS, S.; ERICSSON, J.L.E.: " Enzyme-membrane rela-  
tion-ship in phenobarbital induction of synthesis of  
drug-metabolizing enzyme system and proliferation of  
endoplasmic Membranes ". J.Cell.Biol., 28:181, 1966.

- 329.- ERNSTER, L.; ORRENIUS, S.:-" Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes ". Fed.Proc., 24:1190, 1965.
- 330.- HUTTERER, F.; KLION, F.M.; WENGRAF, A.; SCHAFFNER, F.; POPPER, H.:-" Hepatocellular adaptation and injury. Structural and biochemical changes following dieldrin and methyl butter yellow ". Lab.Invest., 20:455, 1969.
- 331.- HUTTERER, F.; SCHAFFNER, F.:-" Hypertrophic, hypoactive smooth endoplasmic reticulum: a sensitive indicator of hepatotoxicity exemplified by dieldrin ". Science, 161:1017, 1968.
- 332.- DINGELL, Y.V.; FLEINBERG, M.:-" The effects of aliphatic halogenated hydrocarbons on hepatic drug metabolism ". Biochem.Pharmacol., 17:1269, 1968.
- 333.- SASAME, H.A.; CASTRO, J.A.; GILLETTE, J.R.:-" Studies on the destruction of liver microsomal cytochrome P-450 by carbon tetrachloride administration ". Biochem.Pharmacol., 17:1759, 1968.
- 334.- RAISFELD, I.H.; BACCHIM, P.; HUTTERER, F.; SCHAFFNER, F.:-" The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the phenobarbital-induced formation of hepatic microsomal membranes ". Molec.Pharmacol., 6:231, 1970.
- 335.- BARON, J.; THEPHLY, T.R.:-" Further studies on the relationship of the stimulatory effects of phenobarbital and 3,4-benzpyrene on hepatic heme synthesis to their effects on hepatic microsomal drug oxidations ". Arch.Biochem., 139:410, 1970.

- 336.- BROWN,H.D.; CHATTOPADHYAY,S.K.; PENNINGTON,S.N.;  
SPRATH,J.S.; MORRIS,H.P.:-" Mixedfunction oxidation  
in tumors ". Brit.J.Cancer , 25:135, 1971.
- 337.- KATO,R.; TAKAHASHI,A.:-" Decreased hydroxylation of  
steroid-hormones by liver microsomes from rats bea-  
ring Walker carcinosarcoma 256 ".Cancer Res., 30:  
2346, 1970.
- 338.- SUGIMURA,T.; IKEDA,K.; HIROTA,K.; HOZUMI,M.; MORRIS,  
H.P.:-" Chemical,enzymatic,and cytochrome assays  
of microsomal fraction of hepatomas with different  
growth rates ". Cancer Res.,26:1711, 1966.
- 339.- RUBIN,E.; HUTTERER,F.; OHSHIRO,T.; JACOBSON,II,J.H.:  
(Introduced by Popper,H.):-" Effect of experimental  
portacaval shunt on hepatic drug metabolizing enzy-  
mes ". Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 127:444, 1968.
- 340.- DE DUVE,C.; PRESSMAN,B.C.; GIANETTO,R.; WATTIAUX,R.;  
APPELMANS,F.:-" Tissue fractionation studies ". Bio-  
chem.J. 60:604, 1955.
- 341.- ANDERSON,P.J.; COHEN,S.; BARKA,T.:-" Hepatic injury.  
A histochemical study of intracitoplasmic globules  
occurring in liver injury ".Arch.Path.,71:89, 1961.
- 342.- HRUBAN,Z.; SPARGO,B.; SWIFT,H.; WISLER,R.W.; KLEIN-  
FELD,R.G.:-" Focal cytoplasmic degradation ". Am.J.  
Path., 42:657, 1963.
- 343.- NOVIKOFF,A.B.; ESSNER,E.:-" Cytolysomes and mitochon-  
drial degeneration ".J.Cell.Biol., 15:140, 1962.

- 344.- MOE,H.; BEHNKE,O.:-" Cytoplasmic bodies containing mitochondria, ribosomes, and rough surfaced endoplasmic membranes in the epithelium of the small intestine of newborn rats ".J.Cell.Biol., 13:168,1962.
- 345.- HIRSCHORN,R.; KAPLAN,J.M.; GOLDBERG,A.F.; HIRSCHORN,K.; WEISSMAN,G.:-" Acid phosphatase-rich granules in human lymphocytes induced by phytohemagglutinin ". Science, 147:55, 1965.
- 346.- ALLISON,A.C.; MALLUCCI,L.:-" Lysosomes in dividing cells, with special reference to lymphocytes ". Lancet, 2:1371, 1964.
- 347.- ASHFORD,T.P.; PORTER,K.R.:-" Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes ".J.Cell.Biol.,12:198,1962.
- 348.- ARSTILA,A.U.; TRUMP,B.F.:-" Studies on cellular autophagocytosis: the formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration ".Am.J. Path., 53:687, 1968.
- 349.- DETER,R.L.; DE DUVE,C.:-" Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes ".J.Cell.Biol., 33: 437, 1967.
- 350.- DETER,R.L.:-" Quantitative characterization of dense body, autophagic vacuole and acid phosphatase-bearing particle populations during the early phases of glucagon induced autophagy in rat liver".J.Cell.Biol., 48:473, 1971.

- 351.- DETER, R.L.; BAUDHUIN, P.; DE DUVE, C.: - " Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon ". *J. Cell. Biol.*, 35:C-11, 1967.
- 352.- EXTON, J.H.; ROBINSON, G.A.; SUTHERLAND, E.W.; PARK, C. R.: - " Studies on the role of adenosin 3',5'-monophosphate in the hepatic actions of glucagon and catecholamines ". *J. Biol. Chem.*, 246:6166, 1971.
- 353.- HERS, H.G.: - " Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease) ". *Biochem. J.*, 86:11, 1963.
- 354.- BAUDHUIN, P.; HERS, H.G.; LOEB, H.: - " An electron microscopic and biochemical study of type II glycogenosis ". *Lab. Invest.*, 13:1139, 1964.
- 355.- SHELLEY, H.J.: - " Glycogen reserves and their changes at birth and in anoxia ". *Brit. Med. Bull.*, 17:137, 1961.
- 356.- DAWKINS, M.J.: - " Glycogen synthesis and breakdown in fetal and newborn rat liver ". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 111:203, 1963.
- 357.- ROSENFELD, E.L.: - " Control of glycogen metabolism ". *Hepatotropic Factors . CIBA Foundation Symposium*, 55:176, 1964.
- 358.- THYS, O.: - " Lysosomes et glycogène dans les cellules hépatiques: étude ultrastructurale ". *J. Microscopie*, 9:899, 1970.
- 359.- VERITY, M.A.; TRAVIS, G.; CHEUNG, M.: - " Lysosome-vacuolar system reactivity during early cell regeneration ". *Exptl. Mol. Pathol.*, 22:73, 1975.

- 360.- FISZER-SZAFARZ,B; NADAL,C.:-" Lysosomal enzyme activities in the regenerating rat liver ".Cancer Res., 37:354, 1977.
- 361.- QUINTART,J.; BAUDHUIN,P.:-" Uptake of horseradish peroxidase during cell cycle of hepatoma cells in culture ". Arch.Inter.Physiol.Biochim., 84:32, 1976.
- 362.- FISZER-SZAFARZ,B.; SZAFARD,D.:-" Lysosomal hyaluronidase activity in normal rat liver and in chemically induced hepatomas ". Cancer Res., 33:1104, 1973.
- 363.- BUTTERWORTH,S.T.G.:-" Changes in liver lysosomes and cell junctions close to an invasive tumor ".J. Pathol. 101:227, 1970.
- 364.- PARIS,J.E.; BRANDES,D.; ANTON,E.:-" Distribution and properties of lysosomal enzymes in untreated and in irradiated mouse mammary gland carcinomas ". J. Natl.Cancer Inst., 42:383, 1969.
- 365.- NOVIKOFF,A.B.; SHIN,W.Y.:-" The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells ".J.Microscopie, 3:187, 1964.
- 366.- STEINER,D.F.; CHAN,S.J.; TERRIS,S.; HOFMANN,C.:-" Insulin as a cellular growth regulator ". Hepatotropic Factors. CIBA Foundation Symposium, 55, 217, 1978.
- 367.- BUCHANAN,K.D.; VANCE,J.E.; MORGAN,A.; WILLIAMS,R.H.:-" Effect of pancreozymin on insulin and glucagon levels in blood and bile ".Am.J.Physiol.,215:1293, 1968.

- 368.- ADAMS,R.L.P.:-" Periodic activation of lysosomal enzymes during regeneration of the liver ". Biochem. J. , 87:532, 1963.
- 369.- MORLEY,C.G.D.; KUKU,S.; RUBERNSTEIN,A.H.; BOYER,J.L.:-" Serum hormone levels following partial hepatectomy in the rat ". Biochem.Biophys.Res.Comm.,67:653, 1975.
- 370.- WIDMAN,J.J.; FAHIMI,H.D.:-" Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver ".Am.J.Path.,80: 349, 1975.
- 371.- BLACKBURN,G.R.; BORNENS,M.; KASPER,C.B.:-" Characterization of membrane matrix derived from the microsomal fraction of rat hepatocytes ".Biochim.Biophys. Acta, 436:387, 1976.
- 372.- ENGELHARDT,N.V.; LAZAREVA,M.N.; ABELEV,G.I.; URYVAEVA, I.V.; FACTOR,V.M.; BRODSKY,V.Y.:-" Detection of alfafoetoprotein in mouse liver differentiated hepatocytes before their progression through S Phase ". Nature, 263:146, 1976.
- 373.- NAUGHTON,B.A.; KAPLAN,S.M.; ROY,M.; BURDOWSKI,A.J.; GORDON,A.S.:-" Hepatic regeneration and erythropoietin production in the rat ".Science, 196:301, 1977.
- 374.- GROSJEAN-RASSENFOSSE,C.; BARBASON,H.; BETZ,E.H.:-" Etude cinétique de la régénération hépatique chez le rat après résection du seul lobe gauche (hépatectomie du tiers de la masse) ".C.R.Soc.Biol.,169: 1651, 1975.

- 375.- VALVERDE, I.; RIGOPOULOU, D.; MARCO, J.; FALOONA, G.R.;  
UNGER, R.H.: -" Characterization of glucagon like immu-  
noreactivity (GLI) ". Diabetes, 19:614, 1970.
- 376.- GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M.; GLOVER, J.S.: -" The pre-  
paration of  $^{131}\text{I}$ -labeled human growth hormone of high  
specific radioactivity ". Biochem.J., 89:114, 1963.
- 377.- YALOW, R.S.; BERSON, S.A.: -" Immunoassay of endogenous  
plasma insulin in man ". J.Clin. Invest., 39:1157, 1960.
- 378.- HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB, C.W.; BLEICHER, S.J.: -  
Coated charcoal immunoassay of insulin ". J.Clin.  
Endocrinol. Metab., 25:1375, 1965.
- 379.- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, W.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.: -  
" Protein measurement with the Folin Phenol Reagent ".  
J. Biol. Chem., 193:265, 1951.
- 380.- Bligh, E.G.; DYER, M.J.: -" A rapid method of total  
lipid extraction and purification ". Can. J. Biochem.  
Physiol., 37:911, 1959.
- 381.- ROUSER, G.; SIAKOTOS, A.N.; FLEICHER, S.: -" Cuantitative  
analysis of phspholipids by thin-layer cromatography  
and phosphorus analysis of spots ". Lipids, 1:85,  
1966.
- 382.- FOUTS, J.R.; DIXON, R.L.; SHULTICE, R.W.: -" The metabo-  
lism of drugs by regenerating liver ". Biochem. Pharma-  
col., 7:265, 1961.



- 383.- HINO,Y.; IMAI,Y.; SATO,R.: Induction by phenobarbital of hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme system in partially hepatectomized rats ". J. Biochem. 76:735, 1974.
- 384.- ROSS,W.T.Jr.; CARDELL,R.R.: " Proliferation of smooth endoplasmic reticulum and induction of microsomal drug-metabolizing enzymes after ether or halotane ". Anesthesiology, 48:325, 1978.
- 385.- DALLNER,G.; SIEKEVITZ,P.; PALADE,G.E.: " Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. II. Synthesis of constitutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte ". J. Cell.Biol., 30:97, 1966.
- 386.- DALLNER,G.; SIEKEVITZ,P.; PALADE,G.E.: " Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. I. Structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte ". J.Cell.Biol., 30:73, 1966.
- 387.- LEFFERT,H.L.; KOCH,K.S.; RUBALCAVA,B.: " Present paradoxes in the environmental control of hepatic proliferation ". Cancer Res., 36:4250, 1976.
- 388.- HILTON,J.; SARTORELLI,A.C.: " Induction by phenobarbital of microsomal mixed oxidase enzymes in regenerating rat liver ". J.Biol.Chem., 245:4187, 1970.
- 389.- LAMOTTE,M.: " Estadística Biológica ". Ed. Toray Masson 1965.
- 390.- HOSTETLER,K.Y.; ZENNER,B.D.; MORRIS,H.P.: " Abnormal membrane content in subcellular fractions from the Morris 7777 hepatoma". Biochim.Biophys.Acta,441:231, 1976.

- 391.- BERGELSON, L.D.; DYATLOVITSKAYA, E.V.; SOROKINA, I.B.; GORKOVA, N.P.: - " Phospholipid composition of mitochondria and microsomes from regenerating rat liver and hepatomas of different growth rate ". Biochim. Biophys. Acta, 360:361, 1974.
- 392.- ITO, T.; NEMOTO, M.: - " Uber die kupfferschen sternzellen und die Fettspeicherungs-zellen (fat storing cell) in der blutkapillarenwand der menschlichen Leber ". Okajima Folia Anat. Jap., 24:243, 1952.
- 393.- MERINO MORENO, J.: - " Estudios experimentales con tumor hipofisario MtT-F<sub>4</sub>: Patogenia de la hipertensión ". Tesis Doctoral, Univ. Complutense de Madrid, 1977.
- 394.- FAHIMI, H.D.; GRAY, B.A.; HERZOG, V.K.: - " Cytochemical localization of catalase and peroxidase in sinusoidal cells of rat liver ". Lab. Invest., 34:192, 1976.
- 395.- REDDY, J.; SVOBODA, D.: - " Microbodies (Peroxisomes) in the interstitial cells of rodent testes ". Lab. Invest., 26:657, 1972.
- 396.- BRONFENMAJER, S.; SCHAFFNER, F.; POPPER, H.: - " Fat-storing cells (Lipocytes) in human liver ". Arch. Path., 82:447, 1966.
- 397.- ITO, T.; SHIBASAKI, S.: - " Electron microscopic study on the hepatic sinusoidal wall and the fat-storing cells in the normal human liver ". Arch. Histol. Jap. 29:137, 1968.

